



SEMINAR NASIONAL BIOTEKNOLOGI VI

Bioteknologi untuk Indonesia Makmur Sejahtera

Yogyakarta, 2 November 2019



UNIVERSITAS
GADJAH MADA





Program Studi Bioteknologi
Universitas Gadjah Mada

PROSIDING

SEMINAR NASIONAL BIOTEKNOLOGI VI UNIVERSITAS GADJAH MADA

Bioteknologi untuk Indonesia Makmur Sejahtera

**Program Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada
Yogyakarta, 2 November 2019**

KEYNOTE SPEAKERS

Dr. Widodo

(Universitas Gadjah Mada)

Dr. Boya Nugraha

(Hannover Medical School, Jerman)

Dr. Pascal Montoro

(Cirad, Perancis)

Pusat Studi Bioteknologi Universitas Gadjah Mada

Jl. Teknika Utara, Pogung, Yogyakarta, 55281,

Telp : 0274-564305

E-mail : biotech@ugm.ac.id

<http://biotech.ugm.ac.id>

PROSIDING

SEMINAR NASIONAL BIOTEKNOLOGI VI UNIVERSITAS GADJAH MADA

Bioteknologi untuk Indonesia Makmur Sejahtera

Program Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada
Yogyakarta, 2 November 2019

- Keynote Speaker : **Dr. Widodo** (Universitas Gadjah Mada)
Dr. Boya Nugraha (Hannover Medical School, Jerman)
Dr. Pascal Montoro (Cirad, Perancis)
- Reviewer : Dr. Yekti Asih Purwestri, M.Si.
Dr. Dini Wahyu Kartikasari, M.Si.
Dr. Ir. Chusnul Hanim, M. Si.
Dr. Riris Istighfari Jenie, S.Farm., M.Si., Apt.
Dr. Purwanto, M.Sc., Apt.
Dr. Muthi' Ikawati, M.Sc., Apt.
Dr. Abdul Razaq Chasani, M.Si.
Dr. M. Saifur Rahman, M. Eng.
Dr. Nunung Yuniarti, S.F., M.Si., Apt.
Dr. Widhi Dyah Sawitri, S.Si., M.Agr.
Dr. Endah Retnaningrum, S.Si., M.Eng.
Dr. Noer Kasanah, S.Si., M.Si., Apt.
Dr. Artnice Mega Fathima
- Editor : Chahyaning Ardhiani, S.P.
Rosyida Ismi Baroroh, S.P.
Briliana Suryani Kusumakinasih, S.Si.
Maria Ulfah, S.Si.
- Cetakan I : Desember 2020
Penerbit : Pusat Studi Bioteknologi UGM
Alamat : Jl. Teknika Utara, Pogung, Sleman, Yogyakarta 55281
e-Mail : biotech@ugm.ac.id
Website : <http://biotech.ugm.ac.id>

ISBN: 978-623-91470-1-3

All right reserved
No part of this publication may be reproduced without written
permission of the publisher

PENGANTAR

Kemakmuran Indonesia yang berbasis pengelolaan sumber daya alam perlu dioptimalkan dengan memperhatikan faktor keberlanjutan. Bioteknologi memiliki peranan penting untuk meningkatkan kualitas sumber daya alam demi mewujudkan kemakmuran dan kesejahteraan rakyat dalam berbagai aspek seperti pertanian, lingkungan, kesehatan, dan industri.

Melalui komunikasi ilmiah Seminar Nasional Bioteknologi VI dengan mengusung tema “Bioteknologi untuk Indonesia Makmur Sejahtera”, yang beberapa makalahnya diterbitkan dalam Prosiding ini, diharapkan menjadi salah satu sumbangsih dari dunia akademik untuk mendukung pelaksanaan pembangunan Indonesia menuju Indonesia makmur sejahtera.

Kami mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada para pemakalah yang telah mempublikasikan makalahnya di Prosiding ini, serta para reviewer yang telah membantu proses review naskah. Semoga Prosiding ini memberikan manfaat yang sebesar-besarnya bagi kesejahteraan masyarakat dan bangsa Indonesia.

Ketua Panitia,

Dr. Abdul Razaq Chasani, M.Si.

DAFTAR ISI

PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI	iv
SUSUNAN PANITIA	vii
JADWAL ACARA	ix
 Analisis Molekular Daun Jeruk Bergejala Huanglongbing dan Serangga Vektor <i>Diaphorina citri</i> di Kabupaten Jember, Jawa Timur <i>Achmad Himawan, Siti Subandiyah</i>	 1
 Microscopic Appearance of <i>Fasciolopsis buski</i> eggs, Cercariae and Adult from Hulu Sungai Utara, Indonesia <i>Annida, Dian Eka Setyaningtyas, Deni Fakhrizal, Paisal</i>	 9
 Identification of Growth Gene Polymorphisms (GH, GHR, and Pit-1) in Sumba Ongole Cows (SO) <i>Bayu Dewantoro. P. Soewandi, Hartati, Depison, Sri P. Rahmadani</i>	 25
 Effectiveness of UV Rays on The Ability of Selected Soil Bacteria in Decomposing LDPE Plastic <i>Gregorius Nico Adi Setiawan, Felicia Elisabeth, Eunike Ratna Cempaka Dani, Lindayani</i>	 38
 Optimasi ZPT terhadap Induksi Kalus <i>Talinum paniculatum</i> Gaertn. <i>Hulda Natasya Rachmadi, Ratih Restiani</i>	 56
 The Effect on Extraction Time of Kawa Daun Grounds (<i>Coffea cannephora</i>) using Ultrasonic towards Bioactive Components <i>Ifwarisan Defri, Ira Desri Rahmi, Alfi Asben</i>	 72

Alternatif Kombinasi Media Tanam dalam Peningkatan Pertumbuhan Bawang Merah (<i>Allium cepa</i> L.) <i>Intan Adelia Yuli Rahmawati, Ambar Pratiwi</i>	91
Production Process Optimization of Fermented Taro Paste (Poi) with A Variation of The Inoculum Ratio between <i>Leuconostoc mesenteroides</i> and <i>Lactococcus lactis</i> <i>Jayen Aris Kriswantoro, Ulya Alviaredieta, Agatha Nabilla Lestari, Jihan Nisa Al Iffah, Chaerunisa, Dini Achnafani, Pingkan Aditiawati</i>	108
Identifikasi Bakteri pada Telapak Tangan Teknisi Pelayanan Darah di Kabupaten Bantul Yogyakarta <i>Nur'Aini Purnamaningsih, Francisca Romana Sri Supadmi</i>	126
Uji Toksisitas Subkronis Ekstrak Metanol Kulit Buah Kopi Arabika (<i>coffea arabica</i> l.) pada Ginjal Mencit (<i>mus musculus</i> l.) Galur BALB/c <i>Rita Maliza, Alimuddin Tofrizal, Haris Setiawan, Stephanie Fadilatun Humairah Piliang</i>	137
Pengaruh Konsentrasi Minyak Serai terhadap Karakteristik Biodegradable Film dari Rumput Laut <i>Kappaphycus alvarezii</i> <i>Rudi Dungani, Pingkan Aditiawati, Julia Lumbansiantar, Safar Doddy</i>	147
Aktivitas Antimikroba dari Bakteri Endofit Tanaman Obat <i>Curcuma zedoaria</i> Rosc. <i>Rumella Simarmata, Nuriyanah, Liseu Nurjanah</i>	157
Isolasi Open Reading Frame (ORF) 6-Fosfo- β -Glukosidase dari <i>Bacillus</i> sp. T3 dan Karakterisasinya dengan Pendekatan <i>in silico</i> <i>Sih Pirenaningtyas, Muhammad Saifur Rohman, Jaka Widada</i>	171



Pengaruh <i>Freeze-drying</i> dengan Perlakuan Dehidrasi Osmosis terhadap Kadar Air, Aktivitas Air, Total Bakteria, dan Vitamin C pada Buah Pepaya (<i>Carica papaya</i> L.) <i>Siti Atarfa Rahmida, Isty Adhitya Purwasena, Dea Indriani Astuti</i>	187
Tingkat Ekspresi Gen gag-CA Virus Penyakit Jembrana dengan Sistem Penghantaran Kompleks Polylactic-Co-Glycolic Acid (PLGA) sebagai Kandidat Vaksin DNA <i>Stephanie Elcia S.P, Asmarani Kusumawati</i>	209
Pemilihan Lokasi Budidaya Microalga Skala Industri di Yogyakarta dan Jawa Tengah <i>Suhendra, Deri Gustian</i>	220
Aktivitas Ekstrak Metanolik <i>Padina</i> sp. sebagai Renoprotektan <i>Sulistiyono Lie, Nastiti Wijayanti</i>	233
Peranan Bioteknologi dalam Mendukung Program Konservasi Angsana (<i>Pterocarpus indicus</i> Willd), Jenis Pohon Terancam Punah <i>Vivi Yuskianti, Yelnititis</i>	245
In-silico Study of Cucurbitacin as An Alternative Compound for Anticancer <i>Wiko Arif Wibowo, Muhammad Zulfikar, Slamet Widiyanto, Budi Setiadi Daryono</i>	263

SUSUNAN PANITIA

Penasehat

Prof. Ir. Siti Malkhamah, M.Sc., Ph.D.
Prof. Dr. Ir. Siti Subandiyah, M.Agr.Sc.
Dr. Ir. Donny Widiyanto, Ph.D.
Dra. Rarastoeti Pratiwi, M.Si. , Ph.D.

Ketua Pelaksana

Dr. Abdul Razaq Chasani, M.Si.

Sekretariat

Chahyaning Ardhiani, S.P.
Annisa Dewi, S.P.
Indah Nuraini, S.Si.
Fera Aulia, S.Si.

Bendahara

Joko Budisantoso, S,Psi.

Moderator

Prof. Dr. drh. Widya Asmara, SU
Prof. Dr. Ir. Irfan D. Prijambada, M.Eng.
Dr. Tri Rini Nuringtyas, M.Sc.
Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si.

Seksi Acara

Nyoman Yudi Antara, A.Md.AK., S.Si.
Jamaludin, S.Kel.
Lince Ria Sitohang, S.Si.
Putri Diana, S.Pd.
Rizza Untsa Nuzulia, S.Pd.



Seksi Ilmiah

Dr. Yekti Asih Purwestri, S.Si., M.Si.
Kirana Kristina Mulyono, S.Si.
Angga Prasetyo, S.Si.
Anggia Noor Ramadhani, S.Si.

Seksi Prosiding dan Sponsorship

Dr. Dini Wahyu Kartika Sari, M.Si.
Rosyida Ismi Baroroh, S.P.
Briliana Suryani Kusumakinasih, S.Si.
Maria Ulfah, S.Si.

Seksi Konsumsi

Arsiyah, STP.
Tri Purwanti

Seksi Publikasi dan Dokumentasi

Dhani Rinaldi Maulana, S.Farm, Apt.
Christin Hendriyani Bonnu, S.Si.
Aninda Sidar, S.P.
Ranu Bagus Saputro, S.Si.

Seksi Fasilitas dan Perlengkapan

Paryana, S.E., M.P.A.
Muhammad Suyadi, S.Si.
Nur Fathurahman Ridwan, S.Si.
Tony Ruwaedi, S.IP
Sujono
Tukijo
Kaselan
Istarto

JADWAL ACARA

SEMINAR NASIONAL BIOTEKNOLOGI VI

UNIVERSITAS GADJAH MADA

2019

Waktu	Jenis Kegiatan
07.00 – 08.00	Registrasi
08.00 – 08.30	Pembukaan Acara oleh MC
	Menyanyikan lagu Indonesia Raya dan Hymne UGM
	Sambutan Ketua Pelaksana
	Pembukaan Acara oleh Dekan Sekolah Pascasarjana UGM
08.30 – 08.40	Pentas Seni
08.40 – 09.00	Coffee Break
09.00 – 10.40	Keynote Speech I 1. Dr. Widodo (Universitas Gadjah Mada) “Indigenous Lactic Acid Bacteria for The Next Generation of Functional Food”
	Keynote Speech II 2. Dr. Boya Nugraha (Hannover Medical School, Jerman) “Application of Neuroscience in Pathomechanism Study of Chronic Pain”
10.40 – 11.00	Sesi Poster
11.00 – 12.30	Sesi Pararel I
12.30 – 13.15	Lunch Break
13.15 – 14.05	Sesi Pararel II
14.05 – 14.25	Coffee Break
14.25 – 15.30	Keynote Speech III 3. Dr. Pascal Montoro (Cirad, Perancis) 4. “A New Avenue in Rubber Tree Biotechnology”
15.30 – 16.00	Pengumuman Presenter Oral dan Poster Terbaik
	Penutupan

Analisis Molekular Daun Jeruk Bergejala Huanglongbing dan Serangga Vektor *Diaphorina citri* di Kabupaten Jember, Jawa Timur

Achmad Himawan¹, Siti Subandiyah^{2,3}

¹Fakultas Pertanian, Institut Pertanian STIPER, Jl. Nangka II,
Maguwoharjo, Yogyakarta 55282

²Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Flora Bulaksumur,
Yogyakarta, 55281 dan

³Pusat Studi Bioteknologi, UGM, Jl. Teknik Utara. Berek Yogyakarta
55281

*E-mail korespondensi: achmad.himawan@instiperjogja.ac.id

Abstrak. Salah satu buah unggulan yang dibudidayakan di Indonesia adalah jeruk. Penyakit huanglongbing (HLB) merupakan kendala utama budidaya tanaman jeruk. Penularan patogen HLB, bakteri *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), dari tanaman sakit ke tanaman sehat dapat melalui bibit dan serangga vektor *Diaphorina citri*. Beberapa tahun yang lampau, Departemen Pertanian telah mencanangkan program pemberantasan penyakit HLB. Pemerintah menyediakan bibit bebas penyakit dan pengendalian *D. citri*. Salah satu sentra perkebunan jeruk di Jawa Timur adalah di Kabupaten Jember, yang dilaporkan bebas HLB dan *D. citri*. Tujuan penelitian ini adalah menganalisis secara molekular daun bergejala HLB dan *D. citri* yang ada pada perkebunan jeruk di Jember. Metode penelitian adalah survei dan koleksi daun bergejala HLB serta *D. citri* yang ditemukan di perkebunan jeruk di Jember, serta koleksi tanaman jeruk di Agro Techno Park, Universitas Jember. Ekstraksi DNA dan analisis molekular dilakukan di Pusat Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua sampel daun dari perkebunan jeruk tidak mengandung CLas. Ada 5 sampel daun yang berasal dari Agro Techno Park menunjukkan hasil positif mengandung CLas. *D. citri* tidak ditemukan di perkebunan jeruk maupun di Agro Techno Park. *D. citri* ditemukan pada tanaman kemuning di dekat perkebunan jeruk. Hasil deteksi CLas pada *D. citri* yang mengkolonisasi kemuning ternyata negatif semua.

Kata kunci: *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Diaphorina citri*, Huanglongbing, jeruk



Pendahuluan

Jeruk sebagai komoditas buah yang disukai oleh hampir semua kalangan masyarakat. Permintaan buah jeruk di Indonesia tahun 2019 diproyeksikan mencapai 2,77 juta ton dan 1.033.059 ton di antaranya untuk memenuhi kebutuhan industri pangan (Nuryati dan Noviati, 2015) dengan jumlah penduduk diperkirakan 267,9 juta orang (Badan Pusat Statistik, 2015). Pertumbuhan produksi jeruk Indonesia tahun 2014 masih defisit yaitu 1,49%, namun Jawa memberikan kontribusi pertumbuhan produksi yang cukup baik yaitu 10,11%. Sentra produksi jeruk di Indonesia terbesar di Sumatra Utara yaitu berkontribusi sebesar 29,82% disusul oleh Jawa Timur 23,89% di tahun 2010-2014 (Nuryati dan Noviati, 2015). Pemerintah sudah menargetkan kenaikan produksi jeruk. Target peningkatan produksi oleh Dirjen Hortikultura pada tahun 2015-2019 mencapai 2.041.913 ton atau dengan pertumbuhan produksi rata-rata 3,83%. Sampai dengan tahun 2014, produksi jeruk Indonesia masih belum mencukupi kebutuhan konsumsi dalam negeri. Walaupun pertumbuhan produksi untuk ekspor mencapai rata-rata 21,64% namun sebaliknya pertumbuhan impor mencapai 81,83%. Kabupaten Jember merupakan area pemasok produksi jeruk kedua untuk Jawa Timur sesudah Banyuwangi, yaitu 147.763 ton atau sekitar 25,98% (Nuryati dan Noviati, 2015). Oleh karena itu Kabupaten Jember dipilih sebagai area penelitian untuk mengkaji penyebaran penyakit Huanglongbing (HLB) dan serangga penularnya *D. citri*. Sudah beberapa tahun yang lalu Balai Penelitian Jeruk dan Buah Subtropika (Balitjestro), Batu, Malang mencanangkan gerakan pengendalian HLB secara terpadu.

Penyakit HLB adalah penyakit yang sangat merugikan terhadap produksi jeruk Indonesia dan negara-negara lain. Penyakit ini disebabkan oleh *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs). Bakteri ini sangat sulit dikulturkan pada medium buatan. Deteksi CLAs yang akurat hanya bisa dilakukan secara molekuler karena gejala yang disebabkan nya mirip dengan gejala karena penyakit-penyakit lain dan gejala karena kekurangan unsur hara. Lebih lanjut dilaporkan bahwa tanaman sakit HLB mempunyai

kandungan Fe dan Zn yang lebih rendah dari tanaman sehat (Pustika *et al.*, 2008, Masaoka *et al.*, 2011). Deteksi CLas secara molekuler umumnya dilakukan dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR), antara lain menggunakan sepasang primer yaitu HP1asinv dan and Lp1c dengan target amplifikasi DNA sebesar 2,4 Kbp (Bastianel *et al.*, 2005).

Bahan dan Metode

Survei, koleksi daun jeruk bergejala HLB dan *D. citri* dilakukan di dua lokasi yaitu perkebunan jeruk, Kecamatan Umbulsari, Jember, Jawa Timur dan Agro Techno Park, Universitas Jember. Analisis molekuler (deteksi CLas) dilaksanakan di Laboratorium Biokimia, Pusat Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Ekstraksi DNA daun jeruk menggunakan larutan CTAB 2%. Timbang ibu tulang daun jeruk sebanyak 0,1 gram. Ibu tulang daun dipotong kecil-kecil dengan gunting. Potongan-potongan ibu tulang daun dimasukkan ke mortar dan diberi larutan CTAB 2% sebanyak 1 mL. Dengan menggunakan alu, potongan ibu tulang daun digerus hingga lumat. Larutan dimasukkan ke tabung ependorf 1,5 mL. Tabung diinkubasikan di dalam waterbath (65°C; 30 menit). Tabung diputar menggunakan mesin sentrifus (5.000 rpm; 5 menit). Supernatan dipindah ke tabung 1,5 mL baru dan ditambahkan larutan CIAA (24 : 1) sebanyak 600 µL. Tabung digojok agar larutan homogen. Tabung diputar dengan mesin sentrifus (10.000 rpm; 10 menit). Supernatan dipindah ke tabung 1,5 mL baru dan ditambahkan etanol 95% sepenuh tabung. Tabung digojok supaya larutan homogen. Tabung diinkubasikan di *freezer* kulkas selama semalam. Tabung diputar 10.000 rpm, 10 menit menggunakan mesin sentrifus. Supernatan dibuang. Tabung diberi etanol 70% sepenuh tabung untuk mencuci pelet DNA. Tabung diputar 10.000 rpm, 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet DNA dilarutkan dengan larutan TE sebanyak 50 µL. Apabila DNA tidak segera di PCR maka tabung berisi larutan DNA disimpan di *freezer* - 20°C.



Tiap individu *D. citri* diekstraksi menggunakan kit *Quick-DNA Tissue/Insect Miniprep 50 preps* (Zymo Research Corp. USA). Cara ekstraksi sesuai petunjuk dari perusahaan yang membuatnya dengan modifikasi. Satu ekor *D. citri* dimasukkan ke dalam tabung ependorf 1,5 mL dan diberi *Genomic Lysis Buffer* 50 μ L. *D. citri* digerus menggunakan pestel yang terbuat dari *blue tip* yang ujungnya ditumpulkan. Ditambahkan *Genomic Lysis Buffer* 1.000 μ L dan digojok agar homogen. Tabung disentrifus 10.000 rpm selama 2 menit. Supernatan dipindah ke *Zymo-Spin™ IIC Column* dalam *Collection tube* sebanyak 500 μ L. *Column* dalam *collection tube* disentrifus 10.000 rpm selama 2 menit. Larutan di dalam *collection tube* dibuang dan diulang cara itu. Tambahkan *DNA Pre-Wash Buffer* 200 μ L ke *Zymo-Spin™ IIC Column* dalam *Collection tube* baru dan disentrifus 10.000 rpm selama 2 menit. Ditambahkan *g-DNA Wash Buffer* 500 μ L ke *Zymo-Spin™ IIC Column* dan disentrifus 10.000 rpm selama 2 menit. *Zymo-Spin™ IIC Column* dipindah ke tabung ependorf 1,5 mL dan ditambahkan *DNA Elution Buffer* 35 μ L secara langsung ke matriks kolom. Selanjutnya *Column* disentrifus 10.000 rpm selama 1 menit untuk melarutkan DNA. Apabila tidak langsung dipakai maka tabung ependorf yang berisi DNA disimpan di *freezer* - 20°C.

Gen outer membrane protein (omp) C Las diamplifikasi menggunakan primer spesifik HP1asinv (5'-GATGATAGGTGCATAAAAGTACAGAAG- 3') dan Lp1c (5'-AATACCCTTATGGGATACAAAAA- 3') (Bastianel *et al.*, 2005). Campuran mastermix PCR final adalah 25 μ L dengan rincian 2 μ L sampel DNA, 2 μ L untuk tiap primer, 12,5 μ L Bioline dan 6,5 μ L *nuclease free water*. Program mesin PCR sebagai berikut: denaturasi 94°C (2 menit), 40 siklus (94°C, 40 detik; 55°C, 40 detik; 72°C, 3 menit), 72°C (5 menit), hold 4°C. Produk PCR dielektroforesis menggunakan gel agarosa 1,5% dalam larutan TBE 1x. Hasil elektroforesis dilihat di atas lampu UV dan diabadikan dengan kamera digital.

Hasil dan Pembahasan

Hasil survei dan pengambilan sampel daun bergejala HLB dan sampel *D. citri* serta hasil deteksi CLas disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Daftar Sampel Daun Bergejala HLB dan Serangga *D. citri* dari Kabupaten Jember

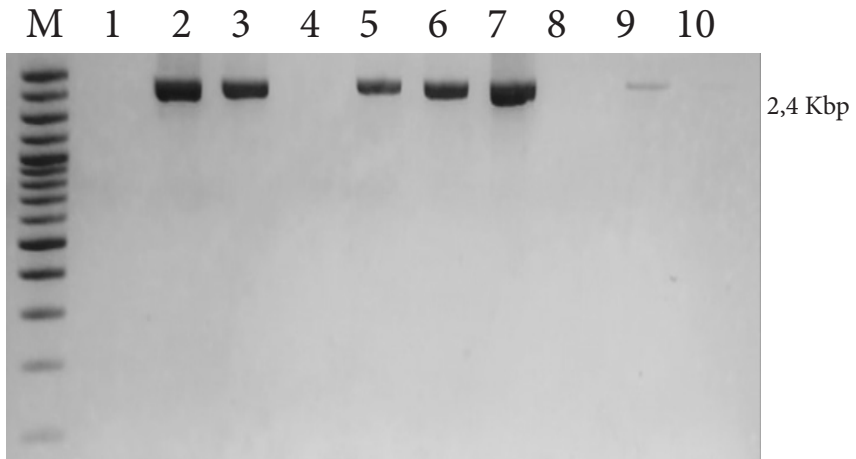
No	Kode Sampel	Jenis Sampel	Lokasi	Tanaman Inang	Hasil Deteksi CLas dengan PCR
1	US 01-1	Daun	Umbulsari, Sukoreno - 1	Jeruk Siem	negatif
2	US 01-2	Daun	Umbulsari, Sukoreno - 2	Jeruk Siem	negatif
3	US 01-3	Daun	Umbulsari, Sukoreno - 3	Jeruk Siem	negatif
4	US 01-4	Daun	Umbulsari, Sukoreno - 4	Jeruk Siem	negatif
5	US 01-5	Daun	Umbulsari, Sukoreno - 5	Jeruk Siem	negatif
6	US 01-6	Daun	Umbulsari, Sukoreno - 6	Jeruk Siem	negatif
7	US 01-7	Daun	Umbulsari, Sukoreno - 7	Jeruk Siem	negatif
8	US 01-8	Daun	Umbulsari, Sukoreno - 8	Jeruk Siem	negatif
9	US 02-9	Daun	Umbulsari, Sukoreno - 9	Jeruk Siem	negatif
10	US 02-10	Daun	Umbulsari, Sukoreno - 10	Jeruk Siem	negatif
11	US 02-11	Daun	Umbulsari, Sukoreno - 11	Jeruk Siem	negatif
12	US 02-12	Daun	Umbulsari, Sukoreno - 12	Jeruk Siem	negatif
13	US 02-13	Daun	Umbulsari, Sukoreno - 13	Jeruk Siem	negatif
14	US 02-14	Daun	Umbulsari, Sukoreno - 14	Jeruk Siem	negatif
15	US 02-15	Daun	Umbulsari, Sukoreno - 15	Jeruk Siem	negatif
16	US 02-16	Daun	Umbulsari, Sukoreno - 16	Jeruk Siem	negatif
17	US 02-17	Daun	Umbulsari, Sukoreno - 17	Jeruk Siem	negatif
18	US 02-18	Daun	Umbulsari, Sukoreno - 18	Jeruk Siem	negatif
19	ATP-03-19	Daun	Agroteknopark UNEJ - 19	Jeruk Sambal	negatif
20	ATP-03-20	Daun	Agroteknopark UNEJ - 20	Jeruk Sambal	positif
21	ATP-03-21	Daun	Agroteknopark UNEJ -21	Jeruk Sambal	positif
22	ATP-03-22	Daun	Agroteknopark UNEJ - 22	Jeruk Siem	negatif
23	ATP-03-23	Daun	Agroteknopark UNEJ - 23	Jeruk Sambal	positif
24	ATP-03-24	Daun	Agroteknopark UNEJ -24	JC	positif
25	ATP-03-25	Daun	Agroteknopark UNEJ - 25	Jeruk Keprok	positif
26	ATP-03-26	Daun	Agroteknopark UNEJ - 26	Jeruk Keprok	negatif
27	ATP-03-27	Daun	Agroteknopark UNEJ -27	Jeruk Keprok	negatif
28	ATP-03-28	Daun	Agroteknopark UNEJ -28	Jeruk Pumelo	negatif
29	ATP-03-29	Daun	Agroteknopark UNEJ -29	Jeruk Siem	negatif
30	ATP-03-30	Daun	Agroteknopark UNEJ -30	Jeruk Siem	negatif
31	US-DC-M-1 sd 10	<i>D. citri</i>	Umbulsari, Sukoreno - 31	Kemuning Jepang	negatif



Dari sejumlah 30 sampel daun yang bergejala HLB ditemukan 5 sampel yang menunjukkan positif pada deteksi CLas dengan PCR menggunakan primer spesifik gen omp CLas (Bastianel *et al.*, 2005). Lokasi sampel yang positif terdeteksi CLas terdapat pada Agrotechnopark di kampus Universitas Jember (Gambar 1), sedangkan lokasi perkebunan-perkebunan jeruk milik Kelompok Tani di Umbulsari Sukoreno tidak terdapat sampel daun (tanaman) jeruk yang positif terinfeksi CLas. Selain itu juga tidak ditemukan adanya populasi *D. citri* di perkebunan-perkebunan jeruk milik Kelompok Tani. Populasi *D. citri* ditemukan pada tanaman hias Kemuning Jepang di luar perkebunan jeruk, namun di halaman rumah petani setempat. Populasi *D. citri* dari tanaman Kemuning Jepang (famili jeruk-jerukan) di Umbulsari, Sukoreno ternyata juga tidak mengandung CLas, sehingga tidak membahayakan menyebarkan HLB, namun demikian apabila inokulum CLas ditemukan maka penyebaran HLB akan sangat mengkhawatirkan. Hasil tersebut menunjukkan bahwa Kelompok Tani di lokasi tersebut cukup intensif (penyemprotan insektisida) dalam melakukan pengelolaan perkebunan jeruknya. Terbukti dengan populasi *D. citri* yang nihil. Di lain pihak, patogen HLB ditemukan di lokasi Agro Techno Park di kampus Universitas Jember, yang merupakan kawasan wisata pendidikan sehingga kadang-kadang dikunjungi oleh wisatawan. Walaupun populasi *D. citri* tidak ditemukan di lokasi tersebut, namun sumber penularan sudah tersedia. Jenis-jenis jeruk yang diambil sampelnya yaitu jeruk Siem, Keprok, jeruk sambal dan jeruk batang bawah (JC), yang semuanya merupakan tanaman inang yang relatif rentan terhadap infeksi HLB. Terbukti bahwa sampel yang positif HLB terutama pada jeruk sambal, kemudian jeruk Keprok dan jeruk batang bawah (JC).

Deteksi keberadaan CLas patogen HLB telah banyak dilakukan dengan beberapa pasang primer spesifik yang berbeda. Primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah primer spesifik CLas pada gen *outer membran protein* (omp) yang dilaporkan mampu mendeteksi berbagai strain CLas (Bastianel *et al.*, 2005). Lebih lanjut deteksi CLas dapat juga dengan menggunakan

primer-primer yang lain seperti yang dilaporkan oleh Fujikawa *et al.*, (2013) dengan target sekuens rDNA pada CLas.



Gambar 1. Visualisasi produk PCR menggunakan primer spesifik CLas sampel DNA daun jeruk bergejala HLB. Keterangan: M = marka DNA 1 Kbp; 1 - 10 = sampel DNA daun jeruk asal Agro Techno Park Universitas Jember

Kesimpulan

Semua sampel daun bergejala HLB dari perkebunan jeruk tidak mengandung CLas. Ada 5 sampel daun bergejala HLB yang berasal dari Agro Techno Park menunjukkan hasil positif mengandung CLas. *D. citri* tidak ditemukan di perkebunan jeruk maupun di Agro Techno Park. *D. citri* yang ditemukan pada kemuning tidak mengandung CLas.

Ucapan Terimakasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Ibu Harti dari Fakultas Pertanian, Universitas Jember dan para petani muda jeruk di Kecamatan Umbulsari, Jember, Jawa Timur. Selain itu, ucapan terima kasih diberikan kepada DRPM Ristekdikti yang telah memberikan hibah dana Penelitian Pasca Doktor tahun 2019.



Kontribusi Penulis

AH melaksanakan survei dan koleksi daun jeruk bergejala HLB serta serangga *D. citri*, analisis molekular di laboratorium, menulis manuskrip. SS menyediakan fasilitas laboratorium, melakukan interpretasi data dan menulis manuskrip. Semua penulis telah membaca dan menyetujui manuskrip versi final.

Konflik Kepentingan

Penulis menyatakan tidak ada bentrokan kepentingan.

Referensi

- Badan Pusat Statistik. 2015. Hasil Survei Penduduk Antar Sensus 2015. Badan Pusat Statistik. <https://www.bps.go.id>
- Bastianel, C., Garnier-Semancik, M., Renaudin, J., Bové, J.M. and Eveillard, S. 2005. Diversity of *Candidatus Liberibacter asiaticus* based on omp gene sequence. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (11):6473-6478.
- Fujikawa T., Miyata S-I, Iwanami T (2013). Convenient Detection of the Citrus Greening (Huanglongbing) Bacterium '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' by Direct PCR from the Midrib Extract. *PLoS ONE* 8(2): e57011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057011>
- Masaoka, Y., A. Pustika, S. Subandiyah, S., A. Okada, E. Hanudin, B. Purwanto, M. Okuda, Y. Okada, A. Saito, P. Holford, A. Beattie and T. Iwanami. 2011. Lower Concentrations of Microelements in Leaves of Citrus Infected with '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. *JARQ* 45 (3), 269 – 275 (2011)
- Nuryati, L. dan Novianti, 2015. Outlook Jeruk. Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian, Sekretariat Jenderal - Kementerian Pertanian. 88 p. ISSN : 1907-1507
- Pustika, A.B., S. Subandiyah, P. Holford, G.A.C. Beattie, T. Iwanami, and Y. Masaoka. 2008. Interaction between plant nutrition and symptom expression in mandarin trees infected with the disease huanglongbing. *Australasian Plant Disease Notes*. 3, 112-115.

Microscopic appearance of *Fasciolopsis buski* eggs, cercariae and adult from Hulu Sungai Utara, Indonesia

Annida¹, Dian Eka Setyaningtyas¹, Deni Fakhrizal¹,
Paisal¹

¹Center of Health Research and Development Tanah Bumbu,
Lokalitbang Street, Gunung Tinggi - Batulicin, Tanah Bumbu District,
South Kalimantan Province, Indonesia

Abstract. Fasciolopsiasis is an intestinal iasis are caused by *Fasciolopsis buski*. Fasciolopsiasis has been known endemic in Indonesia, Hulu Sungai Utara Regency, South Kalimantan Province since 1982 until now, through the discovery of eggs and adult of *F. buski* in stool samples. The first intermediate host at HSU was snail *Indoplanorbis sp.* and *Lymnaea sp.* has also been confirmed through a Polymerase Chain Reaction inspection. Through this paper the characteristics of eggs, redia, cercariae, and adult of *F. buski* are described. This observational study with cross sectional study design carried out the collection of *F. buski* eggs in the stool samples of 314 people examined using the centrifugalitation method (Formalin Ether Technique), redia and cercaria collected using the crushing method through 50 *Indoplanorbis sp.* and 50 *Lymnaea sp.* caught in the surrounding environment, and adult collected through stool samples of 2 patients who have been given oral Praziquantel. Microscopic examination proves that eggs, redia, cercariae, and adult are *F. buski*. The diagnosis of stool sample examination is generally quite sensitive as early detection of fasciolopsiasis, and is the gold standard in qualitative stool examination methods. Areas that are likely to have other intestinal trematodes also need to be confirmed by the discovery of adult stage, because the most specific morphology confirms the species of *F. buski*.

Keywords: Fasciolopsis buski, eggs, cercariae, rediae, adults, Hulu Sungai Utara, Indonesia

Introduction

Fasciolopsiasis is currently estimated to infect around 10 million people in the world, which spread in certain regions,



namely in the countries of Southern and Central China, Taiwan, Thailand, Vietnam, Malaysia, Bengal, Pakistan, Laos, Cambodia, Bangladesh, Japan, and Indonesia (Garcia & Bruckner, 1996; Garcia, 2007; Ideham & Pusarawati, 2007; Annida, 2013).

Fasciolopsiasis was first introduced by Busk in 1843 when this trematode was found in the dead Indian duodenum of a dead Indian sailor (Garcia & Bruckner, 1996; Annida, 2013). While in Indonesia fasciolopsiasis has only been found in the Hulu Sungai Utara (HSU) Regency of South Kalimantan Province, since 1982, when a small child in Sungai Papuyu Village, Babirik Subdistrict took out many leaf-shaped helminths through his stools. In that year the first fasciolopsiasis survey in HSU District was carried out in Sungai Papuyu Village with an infection rate of 27% (148 of 548 stool samples), the highest among school children (79.1%) (Oemijati, 1989).

Fasciolopsiasis figures from 1985 to 2013 shown that cases of fasciolopsiasis are still a health problem in the local population. The results of surveys and studies in 20 villages in the Babirik, Sungai Pandan and Danau Panggang sub-districts show a prevalence rate of 0.3-27.0%. Fasciolopsiasis is almost always found in the Sungai Papuyu and Kalumpang Dalam Villages in Babirik Subdistrict, Putat Atas and Padang Bangkal Villages in Sungai Pandan Subdistrict, and Telaga Mas and Sarang Burung Villages in Danau Panggang Subdistrict. Since 1982, the fluctuating cases of fasciolopsiasis are still ongoing today. The trend of high prevalence occurs in Kalumpang Dalam Village with the prevalence rate never showing 0%, ie 0.2% -15.2% (Anorital, 2008).

Fasciolopsiasis is an intestinal helminth caused by infection of *Fasciolopsis buski*. *Fasciolopsis buski* is an intestinal trematode that is attached to the walls of the human duodenum and jejunum (Garcia & Bruckner, 1996; Garcia, 2007). Another name for this helminth is the Giant Intestinal Fluke of Man or Ginger helminth, because it is shaped like a ginger root, so it is often called a fluke.

The life cycle of *F. buski* requires various stages of life, starting from eggs that come out with feces, in swamp water developing into embryonic eggs until they hatch into miracidia which are

actively swimming, looking for freshwater snails to develop into sporocysts, rediae, and then cercariae.

Types of snails in some countries as the first intermediate host of fasciolopsiasis are *Planorbis spp*, *Trochorbis trochoideus*, *Segmentina hemisphaerula*, *Segmentina trochoideus*, *Gyraulus chinensis*, *Hippeutis cantori*, *Polypylis hemisphaerula* (Garcia & Bruckner, 1996; Ichhpujani & Bhatia, 1998; Purnomo *et al.*, 2003; Garcia, 2007; Handojo & Gandahusada, 2008). Whereas in HSU District, the first intermediate host of fasciolopsiasis are *Indoplanorbis sp* and *Lymnaea sp* (Hairani *et al.*, 2016)

Cercariae then come out of the snail's body, swim in the water looking for aquatic plants as a place of its encystation, and develop into metacercariae. Young fluke attached to these aquatic plants will be eaten by humans, and if the aquatic plants are eaten raw or not cooked well then metaserkaria will develop into adults in the small intestine, and re-issue their eggs with feces.

Residents infected with fasciolopsiasis due to the habit of eating aquatic plants as vegetable matter. Aquatic plants that are eaten raw or undercooked can contain metacercariae cysts, which after swallowing will immediately exist in the duodenum within 25-30 days, attach to the intestinal wall and develop into adult helminths within approximately three months until they are finally found the eggs with feces. The ability and life span of an adult *F. buski* in the body of the host is approximately six to 12 months (Garcia & Bruckner, 1996; Garcia, 2007; Sandjaja, 2007).

As a food borne disease, prevention of fasciolopsiasis is quite easy by stopping the habit of eating raw aquatic plants and not defecating in swamp water. However, the prognosis of fasciolopsiasis which tends to be asymptomatic and does not directly affect death, causes this disease to be included in the neglected disease group, not a top priority in its treatment.

The diagnosis of fasciolopsiasis is determined by the discovery of eggs and/or adult in stool samples examined microscopically. Although modern laboratory examinations have evolved, in some cases stool examination is still needed and cannot be replaced by other tests. Through stool examination can be seen



microscopically morphological from *F. buski* egg stage. In general, fasciolopsiasis examination still uses the method of staining lugol and eosin which are much cheaper and do not use special media for stool examination. However, based on specific *F. buski* eggs that have an operculum, the appropriate stool examination method is the centrifugalitation method (Formalin Ether Technique), which is a combination of the floatation method and sedimentation method (Garcia, 2007).

Until now, to the best of the author's knowledge there are no articles that describe the microscopic diagnosis of *F. buski* using specimens from Indonesia. In this article, we will describe microscopic images of *F. buski* eggs, redia, cercariae, and adult *F. buski* from HSU District, South Kalimantan Province, Indonesia.

Material and methods

This study was an observational study with a cross sectional study design. Data collected were *F. buski* at the egg, adult and cercaria stages.

Egg Collection

Examination of stool samples was carried out on 314 people of Kalumpang Dalam Village to find *F. buski* at the egg stage using the centrifugalitation method (Formalin Ether Technique), which is a combination of the floatation method and sedimentation method (Sandjaja, 2007; Susanty, 2018; Manning *et al.*, 1971). The choice of this method is the best used as an alternative to the native method (Regina *et al.*, 2018). Examination of helminth eggs using a binocular microscope with an ocular lens strenght of 10x and 2 of objective lens: strength 10x and 40x.

Preparation of stool preparations with Formalin-Ether Technique5: stools are taken approximately two gram and emulsified with 10 cc of saline or multiples of solution. The stool emulsion was then filtered using two layers of wet gauze and then put into a tube with a volume of 15 cc. The tubes were centrifuged at 1500-2000 rpm for two minutes, then the supernatant was removed. Sediment is emulsified with saline and re-centrifuged,

then the supernatant is removed (the stool is washed until a sediment is cleaned of impurities). Add 10 cc of 10 percent formalin to the sediment and shaken vigorously, and then left for five minutes. Then added three cc of ether, and the tube is blocked with a rubber stopper and the tube is shaken vigorously. The tube is centrifuged again at 1500 rpm for two minutes, in this way 4 layers will occur, and the helminth eggs are in the lowest layer. Dirt from the tube wall is removed by using a wooden applicator, and dirt is discharged into other vessels. The sediment is mixed with a small amount of liquid which flows back to the bottom of the tube, dripped on object glass. Then iodine or lugol staining is done and covered with a cover glass to be examined under a microscope. The preparations are seen under a binocular microscope with weak magnification (10x10) and strong magnification (10x40).

Adult Collection

Residents whose fist sample was found to be *F. buski* helminth eggs will be given oral therapy Praziquantel, as a drug of choice because the cure rate reaches 90-100%. to examine the presence of adult *F. buski* helminths directly. Helminths can be seen and distinguished without using a microscope (Oemijati, 1989; Garcia & Bruckner, 1996; Garcia, 2007) .

Cercariae Collection

The crushing method was carried out on 50 *Indoplanorbis* sp. and 50 *Lymnaea* sp. living in the swamp water of the Kalumpang Dalam village environment. This method is used to find the shape of *F. buski* in the redia and cercaria stages (Ditjen P2MP & LP, 1989). Inspection using microscope dissecting, with an ocular lens strenght of 10x.

Cercariae examination by crushing method (Ditjen P2MP & LP, 1989). The conch shell is cleaned of impurities and placed in clean petridish, for one species per petridish. Then the conch shell is carefully broken using tweezers. Add one or two drops of water are added to each snail that is broken. Then petridish placed under dissecting microscope. The snail's body is torn to pieces by

using tweezers and needles, while looking for the shape of *F. buski* cercariae in the snail's body.

Results

Fasciolopsis buski eggs were found from two of 314 stool samples examined (0.64 percent). Helminth eggs are between $130\text{--}138\mu\text{m} \times 63\text{--}78\mu\text{m}$, oval in shape, yellowish brown in color, and have thin, clear cell walls, visible small operculum at one end which are more tapered and transparent (Figure 1).

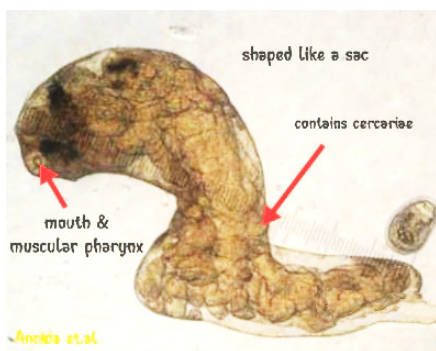


Figure 1. *Fasciolopsis buski* egg stage, magnification 40X, measuring $137.5 \times 77.5 \mu\text{m}$

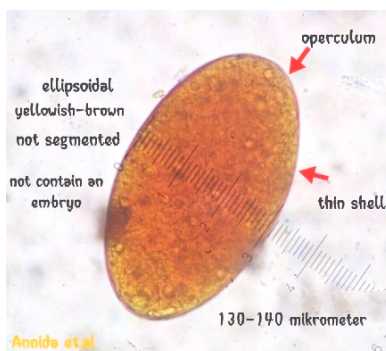


Figure 2. *Fasciolopsis buski* redia stage, magnification 10X.

At the examination of *Indoplanorbis sp.* and *Lymnaea sp.* found redia and cercariae that are still alive and actively moving, making it easy to detect. Redia as a stage before the formation of cercariae, with elongated shape, has a muscular mouth and farings, looks like clear balls in it, which then develops into the next stage as cercariae. Candidates for cercariae appear to have oral suckers and the digestive tract (Figure 2).

The ripe form of cercaria *F. buski* which has come out of ruptured redia is shaped like a tadpole with unbranched, straight and tapered tails at the ends. The tail length is $\pm 180\text{--}350\mu\text{m}$, the body is between $200\text{--}250\mu\text{m} \times 100\text{--}110\mu\text{m}$, has an oral sucker and ventral sucker, muscular farings, and a pair of simple cecum (Figure 3).

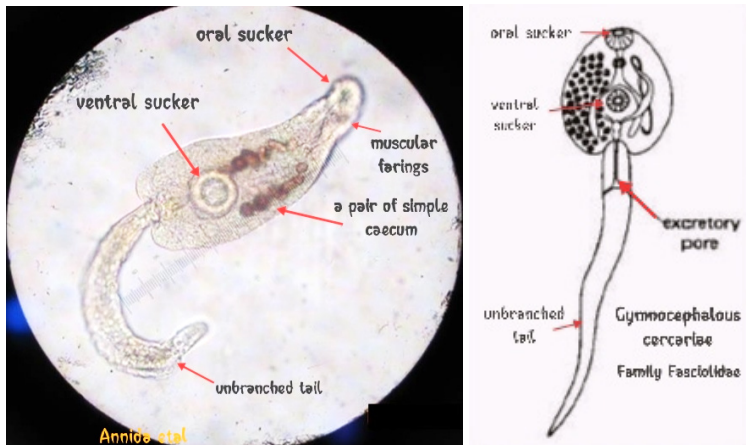


Figure 3. *Fasciolopsis buski* cercaria stage, magnification 10X

Adult of *F. buski* measuring 2.0-75mm x 8-20mm, 0.5-3mm thick, appear to have oral suckers and ventral suckers. Ventral suckers are larger than oral suckers. Helminth-shaped elongated rather oval, thick, without cephalic cone (shoulder) which is typical of the *Fasciola hepatica*. There is a digestive tract with two dead-end caecum (Figure 4).

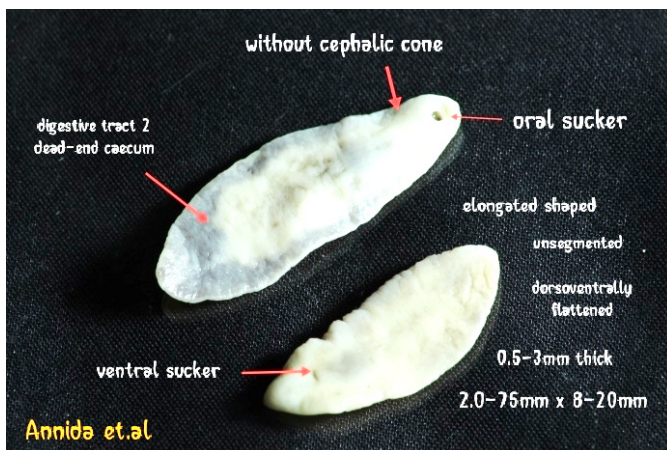


Figure 4. *Fasciolopsis buski* adult stage



Discussion

Egg

Eggs found in stool samples showed morphological characteristics that match those of *F. buski* eggs, ellipsoidal, not segmented, yellowish-brown, large ($130-140 \times 85 \mu\text{m}$), thin shell, operculated eggs (Graczyk *et al.*, 2001; Achra *et al.*, 2015; Saurabh & Ranjan, 2017; Sah *et al.*, 2019).

Differences between trematode eggs tend to be of only size. Morphological and microtopographic variations of *F. buski* from different geographical regions (Achra *et al.*, 2015).

Some species of intestinal trematodes produce eggs that resemble each other and are undistinguishable by microscope. The eggs of *F. buski*, *Echinostoma ilocanum*, *F. hepatica* and *F. gigantica* have the same size and shape so that they are undistinguishable (Garcia & Bruckner, 1996; Garcia, 2007; Ideham & Pusarawati, 2007; Annida, 2013). Based on their size, *F. buski* eggs measuring $130-140\mu\text{m} \times 78-98\mu\text{m}$ tend bigger than *F. hepatica* eggs which are $130-150\mu\text{m} \times 60-90\mu\text{m}$, *F. gigantica* eggs which are $150-190\mu\text{m} \times 70-90\mu\text{m}$, and *Echinostoma ilocanum* eggs which are $83-116\mu\text{m} \times 58-69\mu\text{m}$ (Garcia & Bruckner, 1996; Garcia, 2007; Sandjaja, 2007; Achra *et al.*, 2015; Saurabh & Ranjan, 2017; Sah *et al.*, 2017; Sah *et al.*, 2018; Sah *et al.*, 2018; Sah *et al.*, 2019). The newly released *F. buski* eggs do not contain an embryo, and will undergo embryonation in water for 3-7 weeks. Identification of trematode eggs is more sensitive if measured using an electron microscope.

Trends in the morphology of the intestinal trematode eggs cause difficulties at the time of diagnosis, especially if the area has never known a specific type of endemic trematode, and no adult stage is found as a confirmation of comparison. Unless a biomolecular examination is also done using the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique.

Rediae

Rediae is the development of the egg-miracidium-sporocyst form within three days (Ichhpujani & Bhatia, 1998). Sporocysts will form a second sporocyst (second generation or daughter

sporocyst) that amplifies or multiplies. Sporocysts are shaped like a long bag that contains a lot of rediae. A mature sporocyst will tear and release a lot of the mother's rediae. In the mother's redia, many rediae are formed, which in turn forms cercariae. Rediae is shaped like a sac, has a mouth, muscular pharynx or loose suction head and along a blunt protrusion laterally in the middle of the posterior mid body. Rediae contains clear balls in it, which then develop into the next stage as cercariae. Rediae penetrates the snail tissue into the liquid between the thin layer and the tissue, circulates around the snail's house and finally comes out of the snail's body as cercariae or also called second generation rediae, which is infectious for aquatic plants. It takes 1-2 months to develop miracidium to become cercariae (Purnomo *et al.*, 2003; Sandjaja, 2007).

The form of rediae found in this study cannot yet be used to identify species of trematode, because in general the form of rediae in all trematodes is the same.

Cercariae

Fasciolopsis buski cercariae throughout the world are found in freshwater snails of the genus *Segmentina* (*Polypylis*) *hemisphaerula*, *Segmentina* (*Trochorbis*) *trochoideus*, *Hippeutis* (*Helicorbis*) *umbilicalis*, *Gyraulus*, *Planorbis* spp, *Trochorbis trochoideus*, *Indoplanorbis*, *Anisus* (Manning *et al.*, 1971; Gilman *et al.*, 1982; Handojo & Ismulyuwono, 1988; Garcia & Bruckner, 1996; Ichhpujani & Bhatia, 1998; Garcia, 2007; Ideham & Pusarawati, 2007; Handojo & Gandahusada, 2008; Sah *et al.*, 2017; Sah *et al.*, 2018).

In Sei Papuyu Village, cercariae with unbranched tails identified from the *Indoplanorbis* and *Anisus* snails (Handojo & Ismulyuwono, 1988), whereas in the 2003, Anorital *et al* study there was no founded the cercariae (Anorital *et al.*, 2003). Annida *et al.* identified gymnocephalous cercariae with a single tail which was the main characteristic of *F. buski* in snails *Indoplanorbis* sp. and *Lymnaea* sp (Annida, 2010; Anorital & Annida, 2011; Annida, 2012; Annida, 2013) and by Hairani *et al.* (2016) both types of snails



have been confirmed as the first intermediate host on *F. buski* in HSU District through PCR examination (Hairani *et al.*, 2016).

Cercariae is shaped like a tadpole, its tail is straight and tapered at its tip, not branching. Cercariae are approximately 500µm with a rather round body measuring 195µm x 145µm. This cercariae body is like an adult helminth that has an oral sucker and ventral sucker. Cercariae can swim with their tails or crawl using suction vanity (Handojo & Gandahusada, 2008).

Cercariae has several forms depending on the type, and they have been carefully classified, but considering that adult helminths are present in vertebrate bodies and the form of cercariae in snails, and since the entire life cycle of the trematode is unknown, special cercariae are suitable for each type the adult is not always known (Levine, 1990). But through PCR examination, species determination from cercaria can be determined.

Based on PCR confirmation results in cercariae founded in the body of the snail *Indoplanorbis sp.* and *Lymnaea sp.* (Hairani *et al.*, 2016), so the morphological form of the *F. buski* cercariae can be described in this study (Figure 3).

Adult helminths

Large adult *F. buski* can be seen by eye, with a length of 20-75mm, width 8-20mm and 0.5-3mm thick, reddish-colored, fleshy, elongated and thick, do not have shoulders and cephalic cones, according to the helminths found in the study this (Figure 4). The flaw in this study is that it has not been sensitive in detecting small spines which are located transversely and usually cover the curriculum (Garcia & Bruckner, 1996; Garcia, 2007; Ideham & Pusarawati, 2007; Pant *et al.*, 2015; De & Minh, 2016; Saurabh & Ranjan, 2017; Sah *et al.*, 2019; Ashish & Sharad, 2019).

Fasciolopsis buski adult form has two sucker. A ventral sucker is present before the middle of the body, and an oral sucker surrounds the mouth. The ventral sucker owned by *F. buski* is larger than oral sucker which is about a quarter the size of the ventral sucker. The digestive tract consists of a short prepharynx, a bulging pharynx, a short esophagus, and two clogged cecum,

where the esophagus branches just before the ventral sucker to form two cecum. *Fasciolopsis buski* is hermaphrodite, has male and female reproductive organs. The male reproductive organ consists of a pair of testes that branch off in the middle of the posterior body such as a dendrite located tandem, with channels leading to the seminal vesicles and other channels leading to the cirrus organs, and ending in the genital atrium and genital orifice. The female reproductive system consists of one ovary leading to the ootype, where eggs are formed. The ovary is rather round and branched in the middle of the body. Vitelin channels and seminal receptacles open into the ootype, which surrounds the Mehlis gland. Ootypes leading to the uterus open to the genital atrium and genital orifice. The winding uterus is located behind the abdominal suction vanity. The vascular gland meets the lateral side of the body, it is located laterally from the cecum, covering the helminth's body as high as the ventral sucker vanity to the end of the body (Garcia & Bruckner, 1996).

With direct examination or using a magnifying glass and dissecting microscope, it can be concluded that the helminth found in this study was *F. buski*.

Annida's study on 2006, in Kalumpang Dalam Village, once found an adult intestinal trematode helminth with a different morphology from the Figure 5, on a stool sample that had previously been identified as an egg similar to *F. buski*. Adult helminths have a length of 4-6cm and have cephalic cones. Limitations in the technique of storing the helminth specimen that only one makes the specimen is damaged and cannot be examined either microscopically or molecularly, so the results of the study cannot be further confirmed, and cannot be reported. However, this fact shows the possibility of other intestinal trematodes other than *F. buski* which infects population and develops in HSU District, and requires more specific and sensitive examination techniques (Annida, 2007).

Genetically, *F. buski* can be different at different geographical locations. Ma *et al.* (2017) concluded that *F. buski* from China and India could represent different taxa, while *F. buski* in Vietnam and



China represented the same species. Further research is needed to decode mtDNA and *F. buski* rDNA sequences from various geographical isolates for the complexity of *F. buski* species.

Conclusions

The results of microscopic examination prove the shape of eggs, cercariae, and adult helminths is *F. buski*. Examination of stool samples is quite sensitive as early detection of fasciolopsiasis, and is the gold standard in qualitative stool examination methods. In areas where there may be other intestinal trematodes, it is necessary to confirm the appeal through the discovery of adult helminths. The most specific forms of adult stage morphology confirm the species of *F. buski*.

Acknowledgments

This research was funded by the Center of Health Research and Development Tanah Bumbu, and was supported by Laboratory of Parasitology at the Center of Health Research and Development Tanah Bumbu. The author also thanks the HSU District Health Office, Babirik Health Center, and the community of Kalumpang Dalam Village for their assistance in sample collection.

Authors' contributions

A designed the study. A, DF carried out the laboratory work. A, P analyzed the data. A, DES, P wrote the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

References

- Achra, A., Prakash, P., & Shankar, R. (2015). Fasciolopsiasis: Endemic focus of a neglected parasitic disease in Bihar. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 33(3), 364.
- Annida. (2007). Penanggulangan Fasciolopsiasis Melalui Pemberian Obat 2 Kali Setahun di Kab. Hulu Sungai Utara Kalimantan Selatan Tahun 2006. Laporan Hasil Penelitian Loka Litbang P2B2 Tanah Bumbu. 2007

- Annida. (2010). *Epidemiologi Fasciolopsiasis di Desa Kalumpang Dalam Kecamatan Babirik Kabupaten Hulu Sungai Utara Kalimantan Selatan*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Annida. (2012). *Studi Epidemiologi Komprehensif Fasciolopsiasis dan Pemetaannya di Kabupaten Hulu Sungai Utara, Kalimantan Selatan*. Laporan Hasil Penelitian. Balai Litbang P2B2 Tanah Bumbu, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan RI.
- Annida. (2013). *Kulturisasi Fasciolopsis buski pada Hewan Coba*. Laporan Hasil Penelitian. Balai Litbang P2B2 Tanah Bumbu, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan RI.
- Annida. 2013. *Kajian Penyakit Menular Neglected Disease: Fasciolopsiasis*. Pusat Teknologi Terapan dan Epidemiologi Klinik, Balitbangkes.
- Anorital, A., & Annida, A. (2011). *Hospes Perantara dan Hospes Reservoir Fasciolopsis Buski di Indonesia Studi Epidemiologi F. Buski di Kabupaten Hulu Sungai Utara, Kalimantan Selatan Tahun 2002 dan 2010*. *Vektora: Jurnal Vektor dan Reservoir Penyakit*, 3(2), 110-119.
- Anorital, Ompusunggu S., Dewi R. M. & Kasnodiharjo. (2003). *Model Penanggulangan Fasciolopsis buski di Kalimantan Selatan dengan Pendekatan Sosial Budaya (Tahun Kedua)*. Jakarta: Pusat Penelitian dan Pengembangan Pemberantasan Penyakit, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan RI.
- Anorital. (2008). *Penyakit Kecacingan buski (fasciolopsiasis) di Kabupaten Hulu Sungai Utara Kalimantan Selatan, Analisis dari Aspek Epidemiologi dan Sosial Budaya*. Jakarta: Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Farmasi, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan RI.
- Bruckner, D. A., & Garcia, L. S. (1996). *Diagnostik Parasitologi Kedokteran*. *Buku Kedokteran EGC, Jakarta hal, 81-96*.



- De, N. V., and Minh, P. N. (2016). Prevalence and Species of Fasciolopsis buski in Vietnam. *Indian Journal of Medical Research and Pharmaceutical Sciences*. 3(5); 8-12.
- Ditjen P2MP&LP. (1989). *Petunjuk Teknis Pemberantasan Schistosomiasis*. Sub Dit Filariasis dan Schistosomiasis, Ditjen P2MP&LP, Jakarta.
- Garcia, L. S. (2006). *Diagnostic medical parasitology*. American Society for Microbiology Press, pp 411-416.
- Gilman, R. H., Mondal, G., Maksud, M., Alam, K., Rutherford, E., Gilman, J. B., & Khan, M. U. (1982). Endemic focus of Fasciolopsis buski infection in Bangladesh. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 31(4), 796-802.
- Graczyk, T. K., Gilman, R. H., & Fried, B. (2001). Fasciolopsiasis: is it a controllable food-borne disease?. *Parasitology research*, 87(1), 80-83.
- Hairani, B., Annida, A., Hidayat, S., & Fakhrizal, D. (2016). Identifikasi Serkaria Fasciolopsis buski dengan PCR untuk Konfirmasi Hospes Perantara di Kabupaten Hulu Sungai Utara, Kalimantan Selatan, Indonesia. *BALABA: Jurnal Litbang Pengendalian Penyakit Bersumber Binatang Banjarnegara*, 7-14.
- Handojo I. & Ismulyuwono B. (1988). Pencarian dan Penemuan Bentuk Metaserkaria pada Tumbuhan Air yang Berperan sebagai Inang Perantara II Fasciolopsis buski di Kabupaten Hulu Sungai Utara Profinsi Kalimantan Selatan. Jakarta: Lembaga Penelitian Universitas Indonesia.
- Handojo, I. & Gandahusada, S. (2008). *Fasciolidae*. Dalam *Buku Ajar Parasitologi Kedokteran, Edisi Keempat*, Eds: Inge Sutanto, dkk. PP. 55-8. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. 2008
- Ichhpujani, R. L. dan Bhatia, R.. (1998). *Medical Parasitology, Second Edition*. Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi.
- Ideham, B., & Pusarawati, S. (2020). *Helmintologi kedokteran*. Airlangga University Press.
- Jha, A. K., & Jha, S. K. (2020). Endoscopic diagnosis of Fasciolopsis buski: Revisited (with video). *JGH Open*, 4(2), 284-286.

- Levine, N. D. (1990). *Parsitologi Veteriner*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. Ed. Wardiarto, FKH, UGM.
- Ma, J., Sun, M. M., He, J. J., Liu, G. H., Ai, L., Chen, M. X., & Zhu, X. Q. (2017). Fasciolopsis buski (Digenea: Fasciolidae) from China and India may represent distinct taxa based on mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences. *Parasites & vectors*, 10(1), 101.
- Manning, G. S., Brockelman, W. Y., & Viyanant, V. (1971). An analysis of the prevalence of Fasciolopsis buski in central Thailand using catalytic models. *American journal of epidemiology*, 93(5), 354-360.
- Oemijati, S. (1989). The Current Situation of Parasitic Infections in Indonesia. *Indonesian Bulletin of Health Research*, 17(2), 64069.
- Pant, N. D., Sharma, M., & Khatiwada, S. (2015). Fasciolopsis buski vomited out by a child; the first case reported from Nepal. *Nepal Journal of Biotechnology*, 3(1), 66-67.
- Purnomo, G. W. J, Magdalena L. J., Ayda R., Harijani A. M. (2003). *Atlas Helmintologi Kedokteran*. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Regina, M. P., Halleyantoro, R., & Bakri, S. (2018). Perbandingan Pemeriksaan Tinja Antara Metode Sedimentasi Biasa Dan Metode Sedimentasi Formol-Ether Dalam Mendeteksi Soil-Transmitted Helminth. *Diponegoro Medical Journal (Jurnal Kedokteran Diponegoro)*, 7(2), 527-537.
- Sah, R., Calatri, M., & Toledo, R. (2019). An Autochthonous Human Case of Fasciolopsiasis in Nepal. *The Korean journal of parasitology*, 57(3), 295.
- Sah, R., Khadka, S., Hamal, R., & Poudyal, S. (2018). Human echinostomiasis: a case report. *BMC research notes*, 11(1), 1-6.
- Sah, R., Khadka, S., Khadka, M., Gurubacharya, D., Sherchand, J. B., Parajuli, K., Shah, N.P., Kattel, H.P., Pokharel, B.M. & Rijal, B. (2017). Human fascioliasis by Fasciola hepatica: the first case report in Nepal. *BMC research notes*, 10(1), 1-4.
- Sah, R., Khadka, S., Lakhey, P. J., Pradhan, S., Shah, N. P., Singh, Y. P., & Mas-Coma, S. (2018). Human Case of Fasciola



- gigantica-like infection, review of human fascioliasis reports in Nepal, and epidemiological analysis within the South Central Asia. *Acta Parasitologica*, 63(3), 435-443.
- Sandjaja, bernadus (2007). *Parasitologi Kedokteran "Helminthologi Kedokteran"*. Jilid II. Jakarta : Prestasi pustaka
- Saurabh, K., & Ranjan, S. (2017). Fasciolopsiasis in children: Clinical, sociodemographic profile and outcome. *Indian journal of medical microbiology*, 35(4), 551.
- Saurabh, K., & Ranjan, S. (2017). Fasciolopsiasis in children: Clinical, sociodemographic profile and outcome. *Indian journal of medical microbiology*, 35(4), 551.
- Susanty, E. (2018). Teknik Konsentrasi Formol Eter untuk Mendiagnosa Parasit Usus Formol Ether Concentration to Diagnose Intestinal Parasites. *Jurnal Kesehatan Melayu*, 1(2).

Identification of Growth Gene Polymorphisms (GH, GHR, and Pit-1) in Sumba Ongole Cows (SO)

Bayu Dewantoro. P. Soewandi^{1*}, Hartati², Depison³, and Sri P. Rahmadani³

¹Indonesia Research Institute of Animal Production (IRIAP),
Jl. Veteran III, Bogor 16720, Indonesia

²Indonesian Beef Cattle Research Station,
Jl. Pahlawan Grati, Pasuruan, 67184, Indonesia

³Animal Husbandry Faculty, Jambi University, Mendalo Darat,
Jambi, 36122, Indonesia

Abstract. In Indonesia, Sumba Ongole (SO) cows are local cows which are used as beef cattle. As a beef cattle, the growth trait becomes an important trait to be improved the genetic and to be characterized the genetic diversity. Therefore, this research aim was to identify the polymorphisms of three candidate growth control gene (GH, GHR, and Pit-1) in Sumba Ongole (SO) cattle. This study used 66 SO cows from East Nusa Tenggara by using PCR-RFLP method. Genotype and allele analysis will be calculated Hardy-Weinberg equilibrium, heterozygous value and PIC (polymorphic information content) value. The results showed that the GH | MspI gene, the GHR | AluI gene and the Pit-1 | HinfI gene in SO cattle populations were polymorphic. In other that, the results of the study suggested that the GH | MspI and Pit-1 | HinfI genes had low diversity, but the GHR | AluI gene had a high diversity. The conclusion of this study is that the GHR | AluI gene has a moderate variety and can be a marker candidate for growth selection in SO cows.

Keywords: *Identification, polymorphism, gene of growth, Sumba Ongole cattle*

Introduction

Sumba Ongole (SO) cattle one of local cattle in Indonesia. In 1905, SO cattle was imported by the Dutch East Indies government from India. It was placed and was adapted in East Sumba, Nusa Tenggara Timur (Anwar *et al.*, 2015). The SO cattle was one of the local breed that has good potential. The potency of SO cattle is



the age of adult sex was 9–18 months, estrous periode was 20–30 hours, estrous cycle 18–26 days, the age of first parity 3,1–3,2 years and calving interval 17–19 months (Sodiq & Hidayat, 2014).

In Indonesia, SO cattle was used as beef cattle. Improvement of SO cattle potency as beef cattle can be done by selection. The effort of genetic quality improvement can be conducted by selectin to traits which had the high economic value (Diyono, 2009). Selection which was conducted have to know genetic variety in SO cattle. The genetic variety is needed in the breeding of livestock because the existence of genetic variety, it is possible to improve a good quality genetic (Astuti, 2004). The variety growth of SO need that was be identified to be as the basis for improving genetic quality in SO cattle.

The growth was controled by more gene which are divided into major genes with large effects and minor genes with small effects, one of gene that is thought to be the main gene in influencing growth is a growth hormone coding gene that plays a role in the secretion of growth hormone (Sutarno *et al.*, 2005). Some of the genes that are thought to be the main genes in influencing growth are the growth hormone receptor (GHR), the growth hormone (GH) gene and the pituitary specific transcription factor (Pit-1) gene.

GH gene is very important role in the body, especially for growth and metabolism. GH gene was needed to tissue growth, fat metabolism, reproduction role, lactation and normal body growth (Beauchemin *et al.*, 2006). According to Silveira *et al.*, (2008) that the GH gene is used as a candidate for genetic markers for growth traits.

In addition to the GH gene, the GHR gene is also known to affect growth in beef cattle. The GH and GHR genes are important candidate genes that are used as genetic markers for growth, carcass, and milk production characteristics in livestock (Ge *et al.*, 2003; Beauchemin *et al.*, 2006). The role of growth hormone receptor (GHR) is a mediator of GH biological activity in target cells through stimulation of myogenic signal transduction (Dehkhoda *et al.*, 2018). In addition to the 2 genes mentioned above,

there is the Pit-1 gene which has a role in growth. The GH gene is transcribed and translated in the anterior pituitary gland, where transcription is controlled by pituitary specific transcription factor (Pit-1) and homeobox proteins from Pit-1 (Prop1) (Pfaffle *et al.*, 1999). This Pit1 gene is also known to have a significant correlation with birth weight and pre-weaning growth in Angus cattle (Zhao *et al.*, 2004). Therefore, the aim of the study was to identify GH, GHR and Pit1 gene polymorphisms in SO cattle.

Materials and methods

Blood sample and DNA extraction

SO cow samples in this research were 66 heads. SO cattle was came from Waingapu regency, Nusa Tenggara Timur (NTT) province. Isolation of DNA from blood was extracted using a DNA extraction kit (Zymo research). DNA extraction procedures are conducted based on the manufacturer's protocol.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

GHR | *AluI*, GH-L2 | *MspI*, dan Pit-1 | *HinfI* amplification gene used primer as in Table 1.

Table 1. length, exon, primer sequences and assesion number of the three candidate of growth hormone gene

Lokus	Panjang (pb)	Exon	Primer sequences	Assesion number GenBank	Reference
GHR <i>AluI</i>	342	Ekson 10	F:5'-GCT AAC TTC ATC GTG GAC AAC-3' R : 5'-CTA TGG CAT GAT TTT GIT CAG-3'	AF140284.1	(Di Stasio <i>et al.</i> , 2005)
GH-L2 <i>MspI</i>	327	Ekson 3 dan 4	GH5: 5'-CCCACGG GCAAGA ATGAGGC-3' GH6: 5'-TGAGGAAC GCAGGGGCCCA-3'	JQ711182.1	(Sutarno <i>et al.</i> , 2005)
Pit-1 <i>HinfI</i>	1301	Ekson 5 dan 6	F : 5'-CAATGAGAAAGT TGGTGC-3' R : 5'-TCTGCATTCGAGA TGCTC-3'	Y15995.1	(Moody <i>et al.</i> , 1995)

PCR was conducted at the final reaction volume of a mixture of 20 μ l containing 3 μ l DNA sample (10-100 ng), 0.2 μ l of each primer, 10 μ l PCR mix (MyTaq, Bioline) and 6.2 μ l aquabidest. The PCR process used Thermocycler (AB System). Temperature amplification with temperature optimization is according to Table 2.

Table 2. Temperature of PCR optimization GH, GHR dan Pit-1 gene in SO cattle

Step	GHR			GH			Pit-1		
	Temp (°C)	Time	Cycle	Temp (°C)	Time	Cycle	Temp (°C)	Time	Cycle
Pre-denaturation	95	1m	1x	95	1m	1x	95	1m	1x
Denaturation	95	15s		95	15s		95	15s	
Annealing	53,8	15s	35x	65,7	15s	35x	54,6	15s	35x
Extention	72	10s		72	10s		72	10s	
Final Extension	72	5m	1x	72	5m	1x	72	5m	1x

PCR products were visualized in 1.5% agarose gel. Electrophoresis was carried out at 120 volts for 40 minutes at electrophoresis tool (MyGel Mini) and visualization of geldoc (Infinity VX2).

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Table 3 shows the PCR product data for GH, GHR and Pit1 genes digested with the enzyme restrtration (Thermo Scientific). The final volume of RFLP is 10 μ l (PCR product 3 μ l, restriction enzymes 0.2 μ l, 10x buffer tango 1 μ l and aquabidest 5,8 μ l). The RFLP product was sprayed with 2% agarose gel at 120 volts for 40 minutes. The gel is visualized in geldoc (Infinity VX2). The size of DNA fragments is compared with 50 bp DNA markers (Thermo Scientific).

Table 3. Enzim restriction loci, restriction sites, number of bands, optimization temperatures and times for RFLP

Locus	Site in sequenca	Number of band	Base pair (bp)	Optimization temperature (°C)	Time (hour)
GHR AluI	5' AG CT 3'	2	101, 50	65	2,5
GH-L2 MspI	5' C CGG 3'	1	104	37	2,5
Pit-1 HinfI	5' G ATTC 3'	3	260, 617, 379	37	2,5
	5' G ACTC 3'				
	5' G AATC3'				

Data Analysis

RFLP results will be analyzed of allele and genotype frequencies, Hardy-Weinberg (H-W) balance, heterozygosity and polymorphic information content (PIC). These data will be analyzed descriptively.

Results

In Figure 1 was shown the result of GHR gene with *AluI* enzyme restriction that was three genotypes in SO cattle (AA (191, 101 dan 50 bp), AG (191, 151, 101 dan 50 bp) and GG (191 dan 151 bp)). research that conducted on other cattle also found the same results, so the results of this study are in accordance with previous studies. (Zulkharnaim *et al.*, 2010) had found GHR gene of Bali cattle that were there three genotypes (AA, AG and GG). Besides, in PO cattle had been found three same genotypes (Hartati *et al.*, 2019).

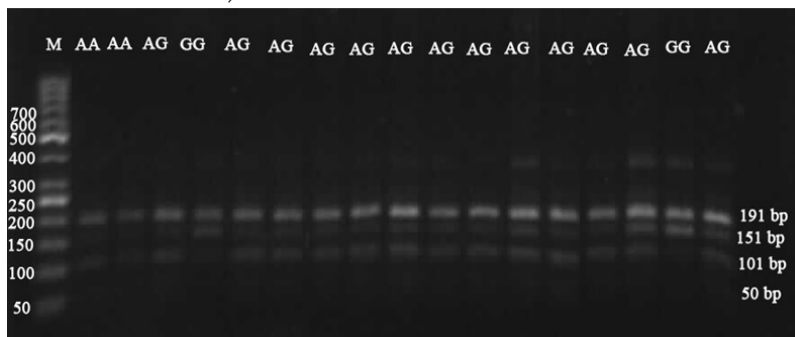


Figure 1. The result of GHR gene used *AluI* in SO cattle.

Restriction site of GH gene in SO cattle was shown in Figure 2. There were three genotypes ((+/+) (223 dan 104 bp), (+/-) (327, 223 dan 104 bp) and (-/-) (327 bp)) that was found in the result of this study. Several studies found the same results in this study. PO cattle in (Hartati *et al.*, 2019) and (Sutarno *et al.*, 2005) research also found 3 genotypes in the GH gene. Therefore, the results of the study found today are the same as the GH gene in previous cattle.

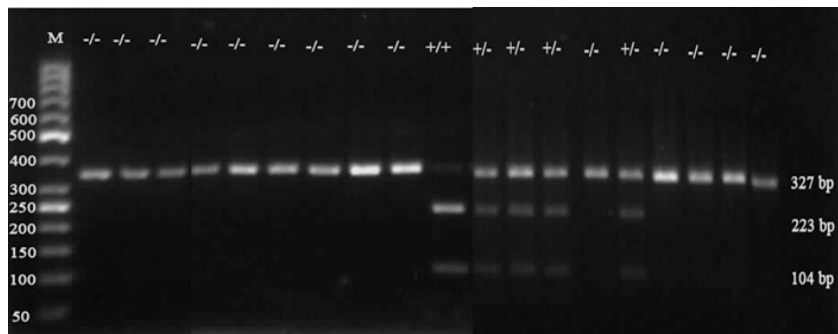
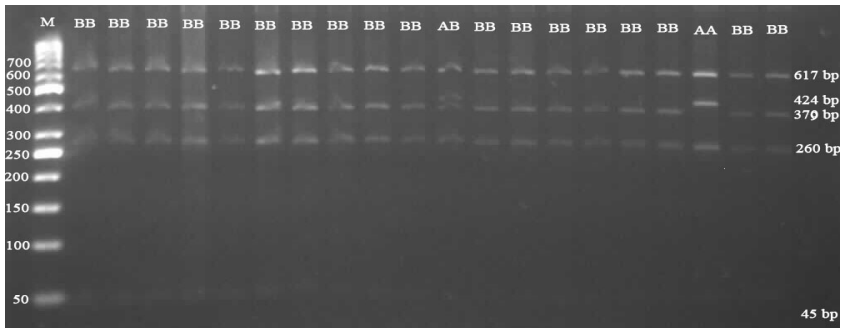


Figure 2. The result of GH gene used *MspI* in SO cattle

Three genotypes of Pit-1 | *HinfI* gene are presented in Figure 3 (AA, AB and BB). The AA genotype has an amplicont size of 617, 424 and 260 bp; whereas genotype AB has an amplicont size of 617, 424, 379, 260 and 45 bp; and the BB genotype has amplicont size 617, 379, 260, and 45 bp. The result of this research has different results with several studies that have been identified. Hartati *et al.*, (2018) and Mukesh *et al.*, (2008) have found that there are two genotypes in PO Grati and Ongole (AB and BB) cattle (AB & BB).



Picture 3. The result of Pit-1 gene used *HinfI* in SO cattle

Discussion

The SO cattle's genotype is different from the previous research because the diversity in breed of SO cattle. Based on Mukesh *et al.*, (2008) that A allele is significantly associated with milk, milk protein and body shape. In this SO cow might have been selected directly so genotype AA to appear. Therefore, the results showed that 3 genotypes appeared in SO cows originating from Waingapu Regency, NTT.

Tabel 4. Alel frequency and genotype, *chi-square* test and PIC value of GHR, GH dan Pit-1 gene in SO cattle.

N	Σ	GHR Genotypes			Alel Frequency		χ^2
		AA	AG	GG	A	G	
66	Observed	2	61	3	0,49	0,51	47,57 ^a
	Expected	15,98	32,99	17,03			
		GH Genotypes			Alel Frequency		χ^2
		+/+	+/-	-/-	+	-	
66	Observed	1	18	47	0,15	0,85	0,24
	Expected	1,53	17,01	47,46			
		Pit-1 Genotypes			Alel Frequency		χ^2
		AA	AB	BB	A	B	
66	Observed	1	18	47	0,15	0,85	0,24
	Expected	1,53	17,01	47,46			

χ^2 ($P < .05$) and subscripts in the same column (^a) show significantly different result.



Table 4 presents the allele frequencies and genotypes of GHR, GH and Pit-1 genes in SO cattle. Based on the results of research that diversity occurs in allele frequencies and genotypes of three growth genes. This diversity can be influenced by evolution within a population due to migration, mutation and selection. According to (Nur Khoiriyah, 2014) changes in allele and genotype frequencies in a population indicate that evolution at a small level (genes) has occurred. Based on Harris (1994) statement that if the allele frequency value is more than 0.99 then the gene is said to be monomorphic. Therefore, three SO cattle growth genes are polymorphic.

In addition, Chi-square test for GHR, GH and Pit-1 genes is shown in Table 4. Based on the results of Chi-square test, the diversity in the GHR gene in SO cattle was significantly different ($P < .05$). These results indicate that the SO cow GHR gene is unbalanced. This unbalanced condition can be caused by migration and non random mating. Some factors that can disrupt the balance of population are mutations, selection, migration and genetic drift (Falconer & Mackay, 1996).

Tabel 5. Nilai PIC, H_o dan H_e gen GHR, GH dan Pit-1 pada sapi SO.

Gene/Enzyme	N	Heterozygosity		PIC
		H_o	H_e	
GHR <i>AluI</i>	66	0,92	0,50	0,38
GH <i>MspI</i>	66	0,27	0,26	0,22
Pit-1 <i>HinfI</i>	66	0,09	0,12	0,11

Ket : Polymorphic information content (PIC), Observed Heterozigositas (H_o); Expected Heterozigositas (H_e).

In addition to Chi-square test, another indicator that shows population imbalance is the difference in the value of H_o and H_e in the GHR gene. Heterozygosity values are used to determine genetic diversity, the high value of heterozygosity in a livestock population is caused by outbreeding mating (Mulliadi & Arifin 2010). In Table 5 it can be seen that there is a difference between the observed heterozygosity values (H_o) and expected heterozygosity

(H_o). The difference between H_o and H_e is an indicator of genotype imbalance in the population. Statement from Tambasco *et al.*, (2003) that indicators of genotype imbalance in populations can be observed from contrasting differences between the values of H_o and H_e .

Opinions from Agung *et al.*, (2017) that the greater H_o value is caused by the selection process and the lack of introduction of males from outside so that the possibility of inbreeding is high. This imbalance in the GHR and GH gene genotypes may result from cases of inbreeding due to limited population due to slaughter of productive females. Priyanto (2016) states that productive female beef cattle slaughter in NTT reaches 65% or higher than the national level (28%). In the Pit-1 gene, the value of H_o and H_e shows that SO cattle have been selected so that it causes more BB genotypes. Machado *et al.*, (2003) indicate that if the value of H_o is lower than the value of H_e ($H_o < H_e$) because there has been intensive selection and the possibility of mating in groups/endogamy.

In addition to the value of H_o and H_e , in Table 5 also shows the PIC gene values GHR, GH and Pit-1. Based on the PIC 3 gene value, it can be seen that the highest PIC value is the GHR gene PIC value. The PIC value in the GHR gene in this study falls into the medium category, while the PIC value of the GH and Pit-1 genes is low. Botstein *et al.*, (1980) states that the PIC value ≥ 0.25 is the low category, the PIC value $0.25 < \text{PIC} < 0.5$ is the medium category and the PIC value PIC 0.5 is high. Based on the PIC value, the GHR gene value is high and has a chance to become a marker assisted selection (MAS) when compared to the other two genes (GH and Pit-1). Huda *et al.*, (2015) states that PIC values in the moderate to high category can be used as genetic marker and are informative enough as gene marker for linkage analysis in populations.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short *Conclusions* section, which may stand alone or be included as a subsection in the *Discussion* section.



Acknowledgments

The author thanks the Indonesian Agency of Agricultural Research And Development (IAARD), Agriculture Ministry of Indonesia for funding research through *Kerjasama, Pengkajian dan Pengembangan Pertanian Strategis* (KP4S) program (Hibah No. 90.22/HM.230/H.1/05/ 2017.K). The author also thanks Indonesia Research Institute of Animal Production (IRIAP) for providing laboratory facilities that can be used through collaborative research. The author also thanks the molecular technician in Indonesia Research Institute of Animal Production (IRIAP) (Ms. Anne Sukmara) who assisted this research and Winni Liani Daulay (undergraduate student) who helped assist in the molecular laboratory. The author also thanks everyone involved in this study.

Authors' contributions

BDP and H designed the study. BDP and SPR carried out the laboratory work. BDP, H and SPR analyzed the data. BDP, H and D wrote the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

References

- Agung PP, Anwar S, Putra W, Said S. 2017. Keragaman gen Growth Hormone (GH) pada beberapa rumpun sapi lokal Indonesia Growth Hormone (GH) gene polymorphism in several Indonesian local breeds cattle. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon.* 3:304–308.
- Anwar S, Agung PP, Wulandari AS, Sudiro A, Said S, Tappa B. 2015. Deteksi polimorfisme gen growth hormone (GH) pada sapi Sumba Ongole (SO). *PROS SEM NAS MASY BIODIV INDON.* 1:398–403.
- Astuti M. 2004. Potensi dan Keragaman Sumberdaya Genetik Sapi Peranakan Ongole (PO). *Wartazoa.* 14:30–39.
- Beauchemin VR, Thomas MG, Franke DE, Silver GA. 2006. Evaluation of DNA polymorphisms involving growth hormone relative to growth and carcass characteristics in Brahman steers. *Genet Mol Res.* 5:438–447.

- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 32:314–331.
- Dehkhoda F, Lee CMM, Medina J, Brooks AJ. 2018. The growth hormone receptor: Mechanism of receptor activation, cell signaling, and physiological aspects. *Front Endocrinol (Lausanne).* 9:1–23.
- Diyono R. 2009. Karakteristik ukuran tubuh dan polimorfisme gen GH, GHRH dan Pit-1 pada populasi kerbau di Banten. Tesis. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Falconer, D.S. and T.F.C. Mackay. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics.* Longman Group Ltd. England.
- Ge W, Davis ME, Hines HC, Irvin KM, Simmen RCM. 2003. Association of single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and growth hormone receptor genes with blood serum insulin-like growth factor I concentration and growth traits in Angus cattle. *J Anim Sci.* 81:641–648.
- Harris, H. 1994. *Dasar-Dasar Genetika Biokemis Manusia.* Edisi ketiga, diperbaharui penerjemah : dr. Abdul Salam M Sufro, Ph.D. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Hartati H, Anwar S, Soewandi BDP. 2018. Genetic polymorphism of pit-1 | hinfI gene in Grati-Ongole grade cattle at Indonesian beef cattle research station. *J Indones Trop Anim Agric.* 43:315–322.
- Hartati H, Soewandi B, Hapsari A, Anwar S, Pamungkas D. 2019. Identification of GH | MspI and GHR | AluI Gene Polymorphism and its Association with Calf Birth Weight of Grati-PO Cattle. *J Ilmu Ternak dan Vet.* 24:49–55.
- Huda N, Sriasih M, Maskur. 2015. Identifikasi keragaman genetik gen growth hormone receptor dengan enzim restriksi Mbo I (Ghr | Mbo I) pada sapi Bali. *J Ilmu dan Teknol Peternak Indones.* 1:31–39.
- Machado MBB, Alencar MM, Pereira AP, Oliveira HN, Casas E, Coutinho LL, Regitano LC de A. 2003. QTL affecting body weight in a candidate region of cattle chromosome 5. *Genet Mol Biol.* 26:259–265.



- Moody DE, Pomp D, Barendse W. 1995. Restriction fragment length polymorphism in amplification products of the bovine butyrophilin gene: assignment of bovine butyrophilin to bovine chromosome 23. *Anim Genet.* 26:45–47.
- Mukesh M, Sodhi M, Sobti RC, Prakash B, Kaushik R, Aggarwal RAK, Mishra BP. 2008. Analysis of bovine pituitary specific transcription factor-HinfI gene polymorphism in Indian zebuine cattle. *Livest Sci.* 113:81–86.
- Mulliadi D, Arifin J. 2010. Pendugaan keseimbangan populasi dan heterozigositas menggunakan pola protein albumin darah pada populasi Domba Ekor Tipis (Javanese Thin Tailed) di daerah Indramayu (Prediction Equilibrium of Population Used Blood Albumin Pattern of Thin Tailed Sheep P. *J Ilmu Ternak.* 10:65–72.
- Nur Khoiriyah Y. 2014. Karakter Genetik Populasi Bedeng 61B Desa Wonokarto Kabupaten Lampung Timur Pasca Program Kolonisasi Pemerintah Belanda. *Biog J Ilm Biol.* 2:132–137.
- Pfaffle R, Blankenstein O, Wuller S, Kentrup H. 1999. Combined pituitary hormone deficiency: Role of Pit-1 and Prop-1. *Acta Paediatr Int J Paediatr Suppl.* 88:33–41.
- Priyanto D. 2016. Strategi pengembalian wilayah Nusa Tenggara Timur sebagai sumber ternak sapi potong. *J Litbang Pertan.* 35:167–178.
- Silveira LGG, Furlan LR, Curi RA, Ferraz ALJ, de Alencar MM, Regitano LCA, Martins CL, de Beni Arrigoni M, Suguisawa L, Silveira AC, de Oliveira HN. 2008. Growth hormone 1 gene (GH1) polymorphisms as possible markers of the production potential of beef cattle using the Brazilian Canchim breed as a model. *Genet Mol Biol.* 31:874–879.
- Sodiq A, Hidayat N. 2014. Kinerja dan Perbaikan Sistem Produksi Peternakan Sapi Potong Berbasis Kelompok di Pedesaan. *J Agripet.* 14:56–64.
- Di Stasio L, Destefanis G, Brugiapaglia A, Albera A, Rolando A. 2005. Polymorphism of the GHR gene in cattle and relationships with meat production and quality. *Anim Genet.* 36:138–140.

- Sutarno, Junaidi A, Tappa B. 2005. MspI polymorphism of bovine growth hormone gene on locus-2 and its effect on daily gain of body weight. *Biodiversitas*. 6:77–81.
- Tambasco DD, Paz CCP, Tambasco-Studart M, Pereira AP, Alencar MM, Freitas AR, Coutinho LL, Packer IU, Regitano LCA. 2003. Candidate genes for growth traits in beef cattle crosses *Bos taurus* x *Bos indicus*. *J Anim Breed Genet*. 120:51–56.
- Zhao Q, Davis ME, Hines HC. 2004. Associations of polymorphisms in the Pit-1 gene with growth and carcass traits in Angus beef cattle. *J Anim Sci*. 82:2229–2233.
- Zulkharnaim, Jakaria, Noor RR. 2010. Identifikasi keragaman genetik gen reseptor hormon pertumbuhan (GHR | Alu I) pada sapi Bali. *Media Peternak*. 33:81–87.



Effectiveness of UV Rays on The Ability of Selected Soil Bacteria in Decomposing LDPE Plastic

**Gregorius Nico Adi Setiawan*, Felicia Elisabeth¹,
Eunike Ratna Cempaka Dani¹, Dr. Ir. Lindayani, MM¹**

¹Department of Food Technology, Soegijapranata Catholic University,
Jl. Pawiyatan Luhur IV/1 Bendan Duwur Semarang, 50234

*Corresponding author: Gregorius Nico Adi Setiawan
(gregoriusnico@gmail.com)

Abstract. LDPE plastic is a kind of plastic which is most widely used in the food packaging industry since its characteristics are light and thin but it is strong enough. As we know that plastic cannot be degraded easily. Therefore many studies are currently looking for special potential of microorganisms, especially bacteria, as natural plastic degrading agents. This research was designed to improve the ability of plastic degrading bacteria by inducing it with UV A and UV B rays. This study used some samples taken from three main locations in Jatibarang Landfill, Semarang. There are four methods used in this research. The first screening method was conducted to select the LDPE degrading bacteria and it was followed by the second screening method in order to obtain the culture in solid media. Then, the bacteria was isolated by quadrant streak technique and regrown in other NA plates to obtain the 10 hours bacteria culture. The next one was irradiated with UV A and UV B for 15 minutes then the bacteria goes to the biodegradation rate process. The final result obtained 11 samples from UV A, 5 samples from UV B, and 3 samples from the control samples, that be able to reduce 10% of LDPE sheets' initial weight.

Keyword: *biodegradation rate, LDPE plastic, plastic degrading bacteria, UV induction*

Introduction

Plastic is made of petrochemical-based material that synthetically making by using monomer and few chemicals addition to shaping it into long polymer chains (Shimao, 2001). Indonesia is the second-largest producer of plastic waste in waters

after China which reached 187.2 million tons. The Ministry of Environment and Forestry states that from 100 shops as the members of the Indonesian Retail User Association (APRINDO) can produce 10.95 pieces of plastic bag waste that equal to 65.7 hectares of plastic bag in a year (Purwaningrum, 2016). Meanwhile, based on the data from Semarang City Government Office in 2017, the daily waste production in Semarang City was 1.200 tons and it reached up to 438.000 tons annually, in which 38% of it was non-organic wastes.

There are some kinds of plastic, one of them is polyethylene polymer that consist of $-CH_2-CH_2$ repeating units as the polymer backbone (Sharma *et al.*, 2015). Polyethylene plastic is categorized in two types, there are LDPE plastics (Low Density Polyethylene) that has MW (molecular weight) up to 4800 and HDPE (High-Density Polyethylene) that has MW 93000 (Sangale, 2012). LDPE is widely used in daily life because it is light and not too thick but it is strong enough. Mostly it is used to wrap food and drink containers. The researcher chooses LDPE plastic as the main material in this research because it has a low MW, so it will be easier to cut than another kind of plastic such as HDPE that has a strong straight bonding structure. Some research has been revealed that plastic with low MW will degrade faster and better than plastic with high MW (Yamada-Onodera *et al.*, 2001; Gu, 2003).

There are some technologies used for degrading plastic material such as photo-oxidative degradation, thermal degradation, ozone-induced degradation, mechanochemical degradation, catalytic degradation, and biodegradation (Singh & Sharma, 2008). The biodegradation method is considering to be the safest way for the plastic degradation process because the outcome is expected to be non-toxic to the environment (Singh & Sharma, 2008; Pathak and Navneet 2017a) and redistributed in carbon, nitrogen, and sulfur cycles. Biodegradation process can be enhanced by using abiotic hydrolysis, physical integration, and photo-oxidation, also using such additives and bio-surfactant will increase the hydrophilicity of the polymer and increasing the biodegradation rate (Singh & Sharma, 2008).



Recently researchers are trying to upgrade the microbial ability by using pretreatment in chemicals or certain conditions in order to maximize the ability of microorganisms degrading the plastic component effectively. Microorganisms are able to adapt in the continuous exposure of recalcitrant material such as synthetic polymer and develop new pathways by modifying their own preexisting genetic components by either mutation(s) in single structural and/or regulatory gene or maybe adding a single silent gene when they encounter the foreign compounds (Talkad *et al.*, 2014). This theory creating an idea to enhance the mutation development by using of UV rays or others induced mutation method in order to encourage the ability of microorganisms to be survival by “forcing” them to change the structure of the cell, whether it is the DNA, protein cell, or the fat cell (Santos *et al.*, 2012).

There is some research that studying the effect of induced mutation by UV rays in bacterial species and finding that the mutation bacteria are able to degrade the material better than without the induced mutation. Talkad *et al.*, (2014) using *Pseudomonas putida* that have been induced mutation by using EMS and UVC to degrade pretreated LDPE. Their research finds that induced with UV and EMS in *Pseudomonas putida* are showing better result at biomass reduction. The species of *Deinococcus ficus* that have been exposed to UVC showing that one of the mutants (strain CC-ZG207) is better growth, a slight increase in protease activities, and higher keratinolytic activity after 10 days incubation with a slightly higher in the cell number (Zeng *et al.*, 2011).

The aim of this research is to select the soil bacteria that have a high ability to degrade the LDPE plastic effectively, then it is mutated with the UV (Ultra Violet) rays induction in order to see the effect of UV rays on the effectiveness of bacteria in degrading LDPE plastic.

Materials and Methods

Soil Sampling Process

The soil sampling location was in Jatibarang Landfill, Semarang, Central Java. The samples were collected from three

different sites (figure 1). Each site consists of three spots (figure 2, figure 3, and figure 4), in which the soil temperature and pH were measured and recorded. Soil samples were taken from a depth of 5-10 cm and collected in ziplock plastics.



Figure 1. Location mapping in Jatibarang Landfill

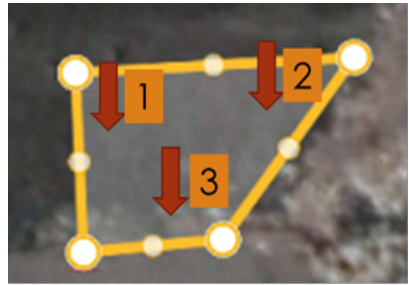


Figure 2. Sampling spot in location A



Figure 3. Sampling spot in location B

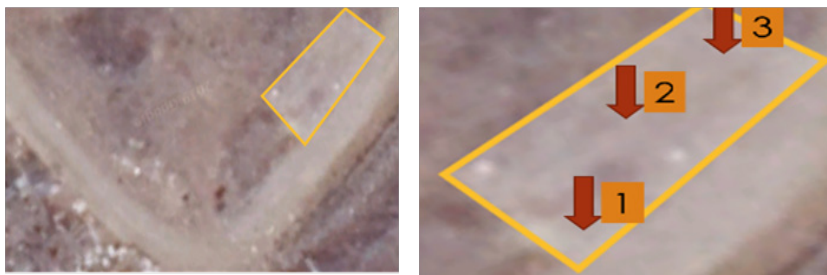


Figure 4. Sampling spot in location C

Making the LDPE (Low Density Polyethylene) Powder

This method was conducted by modified the method proposed by (Deepika *et al.*, (2016), with modifications. LDPE sheets were cut into 2 x 2 cm in size for about 3.5 gram and immersed in 20 ml of xylene in beaker glass. It was boiled for 15 – 20 minutes in 115°C until the LDPE plastic dissolved. The LDPE solution poured to the mortar and crushed while it was still warm with a pestle. Then the LDPE powder was sprayed with 96% of ethanol to remove the residual xylene and let it be evaporated so that the ethanol can be removed from the powder. Then, pour the powder into the porcelain plate and put in the oven at 60°C for 24 hours. After that, took the porcelain out of the oven and sieved it to obtain the same size powder.

Isolation and Screening Plastic Degradar Soil Bacteria

Five grams of soil sample was dissolved in Erlenmeyer flask with 50 ml of sterile distilled water. The sample was incubated overnight under shaking conditions (130 rpm) at the room temperature. The composition for mineral salt broth media were consist of 1000 ml distilled water (K_2HPO_4 , 1.73g; KH_2PO_4 , 0.68g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.03g; NH_4NO_3 , 1g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.02g). It was conducted based on the composition proposed by (Sekar *et al.*, 2011), with some modifications by getting rid of sodium chloride and glucose, also 0.1% (wt v-1) of LDPE powder and 0.1% (v v-1) of Tween 80 that was added to this media.

The screening of soil bacteria was divided into two steps. On the first step, a dilution series was done from 10^{-1} to 10^{-4} dilution. Then, 1 ml of sample was taken and added to Erlenmeyer flask with 25 ml of sterile mineral salt (MS) broth medium. The sample was incubated at 37°C for 1 week and every 24 hours the flask was monitored and shaken (120 rpm) for 1 hour. For the second step, mineral salt agar (MSA) media was used with the same composition as mineral salt broth, about 7 g/900 ml of "Swallow" agar, 0.1% (v v-1) of Tween 80, and 0.1% (wt v-1) of LDPE plastic. This step used two different forms of LDPE plastic, powder and sheets. First, LDPE powder was prepared and added before the mineral salt agar medium. For LDPE sheets, five sheets (1x1 cm) were prepared in each petri dish. Next, 15 ml of MSA was poured into the petri dish. After the agar hardened, 20 μl of MS broth medium from the first screening was spread in the agar media using L rod. The plates were incubated at 37°C for 4-5 days and observed every 24 hours. The bacterial colony from the MSA was inoculated to NA media by quadrant streak method and one-time replication. Then, all the plates were incubated for 24 hours at 37°C .

Induction of Bacterial Mutation using UV Rays

This stage was carried out by UV A and UV B ray radiation, using UVA (Sankyo Denki F10T8BLB lamp, 10W, Japan, main emission line 352 nm) and UVB (Philips Special PL-S 9W/01/2P lamp, Philips, Poland, main emission line 311 nm). Bacterial culture was incubated for 10 hours. Three replicates were used in this stage, for the UV A radiation, the UV B radiation, and the control samples. The plates were irradiated inside the laminar flow cabinet for 15 minutes with a 20 – 30 cm gap between the lamp and the plates. After that, the bacteria cultures were incubated at 37°C for 36 hours.

Effectiveness Test of LDPE Degradation Rate

This stage aims to test the rate of decomposition of LDPE plastic by bacteria that have been treated with UV rays in the previous stage. The bacteria cultures were inoculated in 120 ml bottles contained Mineral Salt Broth media with sterilized 2 x 2 cm LDPE sheets. Then,



the bacteria were incubated at 37°C for 1 week and every 24 hours it was monitored and shaken (150 rpm) for 1 hour.

Data Processing of LDPE Plastic's Degradation Rate

This stage aims to determine the effectiveness level of bacteria that were treated with UV A and UV B compared with the control bacteria. This method was according to the method proposed by (Singh *et al.*, 2016), with modifications. The LDPE plastic sheet was taken from the bottle by using tweezers aseptically. The plastic was dipped several times into distilled water and 70% alcohol, then dried with a clean tissue. It was put into a petri dish and heated using an oven at 45°C for 1 hour. After that, the plastic was put into a desiccator to lower the temperature and re-weighed using analytical scales. The results were recorded and calculated using the formula of the percentage of mass loss as follows:

$$\% \text{ mass loss} = \frac{\text{initial mass} - \text{final mass}}{\text{initial mass}} \times 100\%$$

Morphological Cell Bacteria Analysis

The morphological cell bacteria analysis was using gram coloring method to disguise the bacterial categories, whether it is Gram positive or Gram negative bacteria. Then observed it using light microscope to see the bacteria color, cell shape, and colony shape. Put one drop of sterile distilled water into microscope slides. After that, the bacterial culture that grew in NA medium were taken by ose needle and put into the distilled water drop. In the next step, bacterial cultures were killed by fixation. The dried part of bacteria on top of the microscope slides is called a smear. After the smear was dried, 1-2 drops of primary stain (violet crystal stain) were applied on top of the smear, allowed it to stay for 1 minute and rinsed the slide gently with water. Next, air-dried the slides and applied 1-2 drops of Lugol solution then allowed it to stay for 1 minute and rinsed the slide gently with water. To get rid of the stained, a few drops of alcohol 95% were applied for just 10-20 seconds or until the stained was diminished. Applied a few drops of Safranin solution and allowed it to stay for just 10-20 seconds and rinsed the slides

with water gently then air-dried the slides. Finally, the slides were able to be viewed under a microscope using 10x100 magnified which helped to observe the morphology of bacteria.



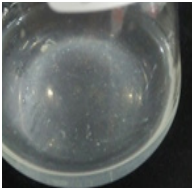


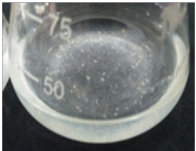


Results and Discussion

1st Screening

This 1st screening process was aim to find bacteria that able to degrade LDPE plastic. This has be done by using visual observation of the culture growth and after observed the sample shook for 1 hour at a speed of 120 rpm. The quantitative data was getting from checking the level of turbidity and the level of dirtiness by using spectrophotometry at the end of incubation time.

These are the samples documentation for daily sample observations and using a code as the sample name. The 1st capital alphabet is describe the sample location at A, B, or C location when sampling; the number in the middle describe the sample obtained from spot number 1, 2, or 3; the lowercase alphabet describe the sample obtained from the 1st or 2nd dilution test; the sign (-) describe sample is the repeated treatment in 1st screening process.

Table 1. Observation result at B2b and B2b- samples

1 st Day / 24 hours		2 nd Days / 36 hours	
B2b sample	B2b- sample	B2b sample	B2b- sample
			
5 th Days / 110 hours		6 th Days / 158 hours	
B2b sample	B2b- sample	B2b sample	B2b- sample
			



From the table 1, it was obtained visually that the longer incubation time, the level of media turbidity will more decrease and the level of dirtiness will more increase. The presence of these impurities was indicated as the presence of microorganism cells that clump with one another. There are a lot of hypothesis and theory behind of the cell clumping and for this occasion the closest theory is about the formation of biofilms on the LDPE surfaces. Biofilms is a mechanisms which allow the bacterial cell to adapt in the environment by producing some proteins such as collagen, fibrin, fibronectin, and laminin as a coating material that enhance the ability of cell-to-cell adhesion in biofilm. The mechanism shown as a matrix of extracellular polymeric substance (EPS) and form a three-dimensional structure that depends on the environment conditions. The inside of this biofilm can be a single species or mixed population of microorganism (Pathak and Navneet 2017b). The LDPE powder as a substrate attracting the bacteria to make a biofilm and it was probably visually observed as a biofilm.

On the table 1, it can be seen that bacteria was able to grow only by utilizing carbon sources from LDPE plastics for their growth energy. Bacteria was using the LDPE plastic powder as a sole carbon source by cutting them into a small molecules by using extracellular enzyme and further absorbed by microbial cells and proceeds by intracellular enzyme (Gu, 2003). The spectrophotometry test was also done in this stage to reinforce the visual observation result in turbidity and dirtiness from the sample.

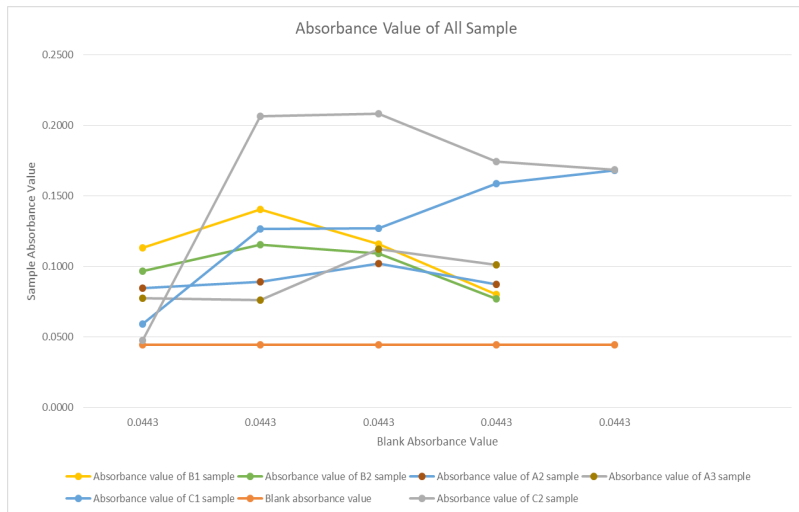


Figure 5. Absorbance value result in the end of incubation time

From this graph (figure 5), it was found that all samples contained microorganisms that grew in them because the absorbance value of the sample is higher than the blank of 0.0443 which only contained growth media. Thus it can be said from the screening stage 1 has been found that bacteria have the potential to degrade LDPE. It can be seen from the graph that a high absorbance value means that there is a significant growth of the bacteria and the forming of biofilms.

2nd Screening

This screening stage 2 began with the growth of bacteria which was able to degrade LDPE plastic in a solid Mineral Salt Agar media so that later the growing bacteria which could be isolated and obtain a pure culture. This stage used 2 treatments for carbon sources in the form of LDPE plastic sheets and also LDPE powder. These serves to see the effectiveness of bacteria to grow and find the best method to be able to isolate pure culture easily. These are the result that obtained from the second screening using Mineral Salt Agar media with the addition of LDPE powder.

Table 2. 2nd screening observation in mineral salt agar media with LDPE powder

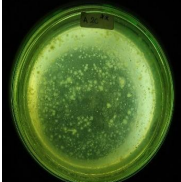
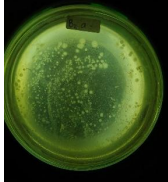
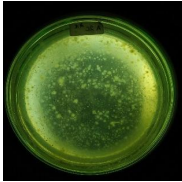
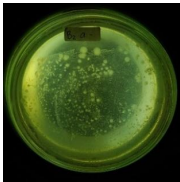
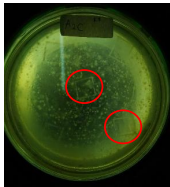
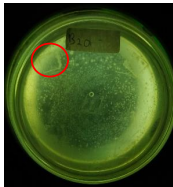
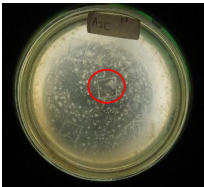
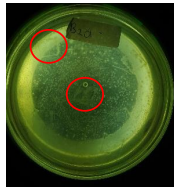
4 th Days / 96 hours		6 th Days / 144 hours	
A2c** sample	B2a- sample	A2c** sample	B2a- sample
			

Table 3. 2nd Screening observation in mineral salt agar media with LDPE sheets



2 nd Days / 48 hours		4 th Days / 96 hours	
A2c** sample	B2a- sample	A2c** sample	B2a- sample
			

**sample was the result of the current sample repeat screening stage 2.

On table 3, it can be seen that there are bacterial colonies which grew attached to the edges of the 5 LDPE sheets inside the petri dish, making it easier to isolate LDPE plastic degrading bacteria than in the plates with LDPE powder (table 2) because the growth was spreading in all parts of the petri dish. Some bacteria grew not attached either to the LDPE plastic sheet or LDPE powder. It can happen because other carbon sources accidentally contained in the media used such as agar as a growth media, which is one of the polysaccharides that have carbon chains in their constituent structures. Then the bio-surfactant Tween 80 is a modulator of hydrophobic interaction between the organism and the polymer (Gilan *et al.*, 2004; Talkad *et al.*, 2014), so it may modulate the biodegradation process, tween 80 which is polysorbate 80 or polyethylene sorbitol ester assuming

20 units of ethylene oxide, 1 sorbitol, and 1 oleic acid. With this explanation it can be seen that there are 2 sources of carbon chains namely sorbitol with the chemical formula $C_6H_{14}O_6$ (PubChem), then oleic acid with the chemical formula $C_{18}H_{34}O_2$ (PubChem). Because of not having media comparison without using tween 80, the researcher assumes that the survived bacteria were able to degrade the ethylene that comes from tween 80 and also comes from LDPE powder and plastic sheets. The next step was isolated the culture to separate it from other species in the plate and the results obtained in the isolation method are as follows:

Table 4. Observation result of bacterial isolation

36 hours	
SA2c*** sample	SB1b*** sample
	

Code S = sample obtained from the culture that uses LDPE sheets (strips)

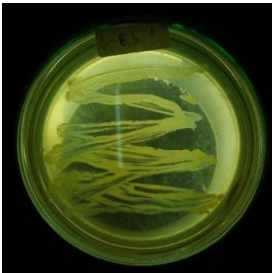

*** sample was a result of sample repetition from the sample with ** at screening stage 2

Therefore, the researcher selected the sample for the next stage based on the characteristics of the samples which are still considered to be able to grow and be isolated such as having a surface that was still slimy or wet. The isolation stage is done to obtain pure culture distribution in a small colony by using the quadrant streak method on the petri dish containing NA media (table 4).

Induce Mutations with UV Rays

These are the results of growing bacteria for 10 hours at 37°C and before they get irradiate:

Table 5. 10 hours of incubation for preparation before UV rays treatment

10 hours	
SB1b-* sample	SA2b-**, sample
	

Code S = sample obtained from the culture that uses LDPE sheets (strips)

**sample was a result of sample repetition at screening stage 2

² sample was a different culture but is located on the same plate

The purpose of using UV rays is to create microbiological biodiversity and their functions in the ecosystem. Beside it, UV rays can be used as a way to improve the biocatalytic activity of microorganisms for a specific purpose. UV rays radiation can be divided into three groups, there are UV A (320 – 400 nm), UV B (280 – 320 nm), and UV C (10 – 280 nm) (Santos *et al.*, 2012). Santos said that UV rays with shorter wavelengths will be able to kill and decrease the activity of microorganisms, while longer-wavelength will be able to broke the DNA structure and restructure it into a better characteristic such as a capability to survive in the extreme condition. In his journal, Santos said that “the DNA reaction into UV A ray has a very strong responsibility which is shown as the growth of ROS (Reactive Oxygen Species) generation, fat oxidation (TBARS), and carbonylation of protein. UV B rays also give an impact with a medium effect between UV A and UV C, which can improve the ability of bacteria to survive better than before by breaking down the structure of TBARS and DNA so bacteria can change the structure and function of the membrane during the exposure of UV B. The effects from UV C radiation is more related to the extent of damage to DNA and producing

mutagenic organisms as well as their inhibitory effects to the organism activity”.

From the above explanation, the researcher decides to use UV A and UV B rays to find their impact on increasing the ability of bacteria to degrading LDPE plastic material. Jagger (1995) at (Santos *et al.*, 2012) said that “the UV irradiation will have more damage effect in Gram-negative bacteria than in Gram-positive bacteria because of the shielding effect from the cell wall”. Research from Zeng *et al.*, (2011) found that induced mutation to *Deinococcus ficus* with the UVC exposure energy is 999 mJ/cm² able to produce 2 mutant strains of *D. ficus* (CC-ZG207 and CC-ZG227) which have opposite result between two of them. The existence of the *lexA-imuB-dnaE2* gene cassette in *D. ficus* serving the possibility of creating superior keratinolytic mutant after the UV induction process. This was working well too in this project, by using UV A and UV B to mutate the bacterial sample before the LDPE biodegradation proceeds.

Effectiveness Test of LDPE Degradation Rate

The result of incubation process for 112 hours for knowing degradation rate of bacteria are as follows:

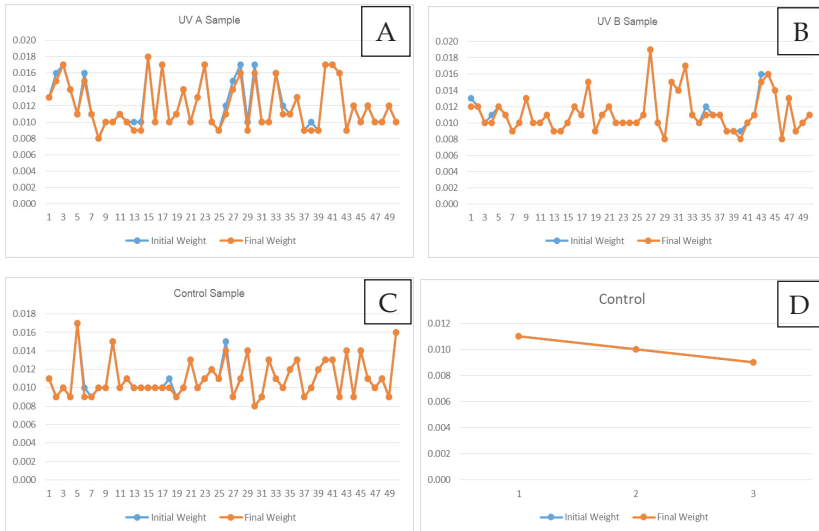


Figure 6. The result of LDPE plastic degradation by using bacteria

Total of 11 LDPE Sheets are reduced in weight at UV A sample, 5 LDPE sheets are reduced in weight at UV B sample, and 3 LDPE sheets are reduced in weight at the Control sample (figure 6). The change in mass of the plastic was 10% (0.001 g) of the initial weight, Based on the results, it can be said that the decomposition rate of LDPE plastics will increase if the culture is irradiated using UV A and UV B. It was compared with the cultures which do not get any UV rays at all.

According to another research at the same topic (Singh *et al.*, 2016), their bacteria show a positive result of biodegradation rate at 10 days (240 hours) of incubation, with a decrease of plastic weight 0.003 gram for the 10- micron thickness of polyethylene and 0.001 gram for the 40-micron thickness of polyethylene. Another research from (Zusfahair *et al.*, 2007) shown a result that in 5 days of incubation, the polyethylene can loss 0.46% of initial weight.

Identification of Bacteria

The following figure is the morphological shape of bacteria culture.

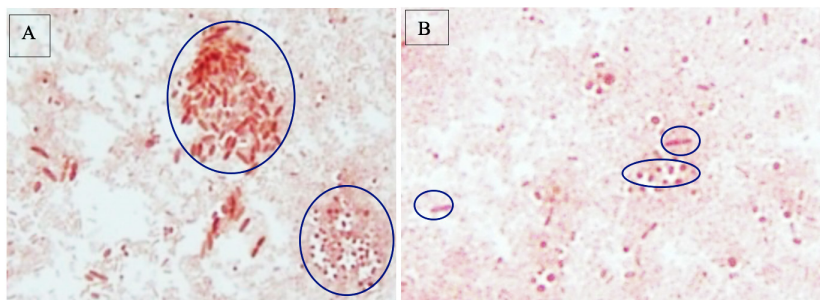


Figure 7. Picture A and B is a SA3c** sample

At this stage, the researcher has not been able to finish the research well for this time, since after observing morphologically with a microscope, it can be known that the bacteria used are still mixed colonies (figure 7). Therefore if the researcher wants to proceed to the identification stage of the bacteria, it needs a long time to isolate the culture to obtain a pure bacterial culture consisting of only one species. These are the documentation we took using a light microscope.

Conclusion

UV A and UV B rays irradiation have an impact on the ability of bacteria in degrading LDPE plastic compared to non-treatment bacteria. Even though the effect of the UV irradiation can be known, the species of the bacteria still unknown, considering the inadequate research time. The result of this research is able to be developed and applied on a large scale, such as for degrading LDPE plastic in the landfills.

Acknowledgement

The corresponding author gives a special thanks to A. Suchawadee Wiratthikowit from Assumption University,



Thailand who guided him in generating this idea for the first time. The financial support was fully accommodated by the Ministry of Research, Technology, and Higher Education, Indonesia through the funding for Student Creativity Programme 2018, with the project title “Effectiveness of UV Rays on The Ability of Selected Soil Bacteria in Decomposing LDPE Plastic”.

References

- Deepika RC, Janani R, Vignesh R, Manigandan P. 2016. Screening of Plastic Degrading Microbes from Various Dumped Soil Samples. *Int Res J Eng Technol*. 3(4):2493–2498.
- Gilan I, Hadar Y, Sivan A. 2004. Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 65(1):97–104.
- Gu JD. 2003. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: Recent research advances. *Int Biodeterior Biodegrad*. 52(2):69–91.
- Pathak VM, Navneet. 2017a. Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach. *Bioresour Bioprocess*. 4(15):31.
- PubChem. Sorbitol | C6H14O6 - PubChem. [accessed 2019a Nov 29]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5780>.
- PubChem. Oleic acid | C18H34O2 - PubChem. [accessed 2019b Nov 29]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oleic-acid>.
- Purwaningrum P. 2016. Upaya Mengurangi Timbulan Sampah Plastik Di Lingkungan. *Jtl*. 8(2):141–147. <https://media.neliti.com/media/publications/64124-ID-none.pdf>.
- Sangale MK. 2012. A Review on Biodegradation of Polythene: The Microbial Approach. *J Bioremediation Biodegrad*. 03(10). doi:10.4172/2155-6199.1000164.
- Santos AL, Oliveira V, Baptista I, Henriques I, Gomes NCM, Almeida A, Correia A, Cunha Â. 2012. Wavelength dependence of biological damage induced by UV radiation on bacteria. *Arch Microbiol*. 195(1):63–74. doi:10.1007/s00203-012-0847-5.

- Sekar S, Mahadevan S, Kumar SSD, Mandal AB. 2011. Thermokinetic responses of the metabolic activity of *Staphylococcus lentus* cultivated in a glucose limited mineral salt medium. Thermokinetic responses of the metabolic activity of *Staphylococcus lentus* cultivated in a glucose limited mineral salt medium. *J Therm Anal Calorim*. 104(April 2011):149–155.
- Sharma M, Sharma P, Sharma A, Chandra S, Asmita K, Shubhamsingh T, Tejashree S, Road DW, Road DW, Raaman N, *et al.*, 2015. Microbial Degradation of Plastic- a Brief Review. *J Acad Ind Res*. 4(6):313–316.
- Shimao M. 2001. Biodegradation of plastics. *Curr Opin Biotechnol*. 12:242–247.
- Singh B, Sharma N. 2008. Mechanistic implications of plastic degradation. *Polym Degrad Stab*. 93(3):561–584.
- Singh G, Singh AK, Bhatt K. 2016. Biodegradation of Polythenes by Bacteria Isolated From Soil. *Int J Res Dev Pharm Life Sci*. 5(2):2056–2062.
- Talkad MS, C C, S K, S QS, Maria S, Raj A, Javed A. 2014. Microbial Degradation of Plastic (LDPE) & domestic waste by induced mutations in *Pseudomonas putida*. *Int J Ethics Eng Manag Educ Website www.ijeee.in*. 1(5):2348–4748.
- Yamada-Onodera K, Mukumoto H, Katsuyaya Y, Saiganji A, Tani Y. 2001. Degradation of polyethylene by a fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Polym Degrad Stab*. 72(2):323–327.
- Zeng YH, Shen FT, Tan CC, Huang CC, Young CC. 2011. The flexibility of UV-inducible mutation in *Deinococcus ficus* as evidenced by the existence of the *imuB-dnaE2* gene cassette and generation of superior feather degrading bacteria. *Microbiol Res*. 167(1):40–47.
- Zusfahair, Lestari P, Ningsih DR, Widyaningsih S. 2007. Biodegradasi Polietilena Menggunakan Bakteri Dari TPA (Tempat Pembuangan Akhir) Gunung Tugel Kabupaten Banyumas. *Molekul*. 2(2):98–106.

Optimasi ZPT terhadap Induksi Kalus *Talinum paniculatum* Gaertn

Hulda Natasya Rachmadi, *Ratih Restiani

*Prodi Biologi, Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana
Jl. Dr. Wahidin Sudirohusodo No. 5-25, Yogyakarta

*Korespondensi penulis : ratih.restiani@staff.ukdw.ac.id

Abstrak. Tanaman ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) adalah tanaman yang dapat dimanfaatkan dalam bidang kesehatan karena berkhasiat sebagai obat diare, anti radang, aprodisiak (obat kuat), dan penambah vitalitas. Berbagai khasiat tersebut dipengaruhi oleh beberapa senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan seperti saponin, flavonoid, dan tannin. Kultur *in vitro* merupakan salah satu cara untuk meningkatkan senyawa metabolit sekunder daun ginseng jawa. Dalam metode kultur *in vitro*, penambahan zat pengatur tumbuh memiliki pengaruh yang penting untuk keberhasilan pembentukan kalus. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ZPT pada berbagai konsentrasi terhadap induksi kalus *T. paniculatum*. Eksplan yang digunakan adalah daun *T. paniculatum*. pada pucuk kedua dan ketiga. Media yang digunakan adalah Murashige and Skoog (MS) dengan penambahan ZPT 2,4D (1; 1,5;2) ppm, BAP (1;2;3) ppm, NAA (1;1,5;2) ppm. Setelah dilakukan inokulasi, kultur diinkubasikan di ruang kultur pada suhu $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ dengan kelembapan 67% dibawah lampu selama 24jam/hari. Respon yang diamati meliputi waktu terbentuknya kalus dan persentase kalus selama 4 minggu pengamatan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jenis ZPT dapat berpengaruh terhadap induksi kalus eksplan daun ginseng jawa. Jenis dan konsentrasi ZPT yang paling efektif adalah 2,4D (2 ppm) + BAP (2 ppm) dengan menghasilkan kalus pada persentase sebesar 100% dalam rata-rata waktu 6 hari. Kalus memiliki skor 100 dengan tekstur berbentuk remah bewarna kuning merah muda.

Kata kunci: Kalus, kultur *in vitro*, *Talinum paniculatum* Gaertn., ZPT, 2,4 D, BAP

Pendahuluan

Tanaman ginseng jawa (*Talinum paniculatum* G.) merupakan salah satu tanaman obat di Indonesia yang berkhasiat bagi

kesehatan manusia (Hidayat, 2005). Tanaman ginseng jawa ditanam sebagai tanaman hias atau tanaman obat, dan terkadang ditemukan tumbuh liar. Ginseng jawa digunakan sebagai obat diare, anti radang, aprodisiak (obat kuat), dan penambah vitalitas (Wijayakusuma, 1994). Selain itu, ginseng jawa mempunyai kandungan senyawa kimia yang berkhasiat bagi kesehatan manusia dalam menyembuhkan penyakit jantung dan insomnia (Rubatzky, 1998). Berbagai khasiat ginseng jawa sangat dipengaruhi oleh senyawa kimia yang terkandung di bagian akar dan bagian daun ginseng jawa. Senyawa kimia tersebut adalah alkaloid, antrakuinon, flavonoid, steroid, antosianin, tannin, dan saponin golongan triterpena yang sering disebut ginsenosida (Popovich & Kitts, 2004). Senyawa metabolit ginsenosida merupakan salah satu senyawa yang paling terkenal pada tanaman *Panax ginseng* C. A. Meyer (Adil & Jeong, 2018). Senyawa ginsenosida memiliki khasiat dalam penyembuhan beberapa penyakit seperti antitumor, antidiabetes, antialergi, antistress, dan antioksidan. Di Indonesia tanaman ginseng jawa (*Talinum paniculatum* G.) dipakai sebagai pengganti ginseng Korea *Panax ginseng* C. A. Meyer (Widiyani, 2006). Namun hingga saat ini akumulasi ginsenosida pada berbagai tanaman ginseng dalam kultur jaringan masih sangat kurang, dan dilaporkan bahwa kandungan ginsenosida akar adventif *Panax ginseng* C. A. Meyer dan *Panax quinquefolium* masih sangat rendah (Huang *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014).

Kultur *in vitro* merupakan salah satu metode yang digunakan untuk meningkatkan produktivitas senyawa metabolit sekunder (Vanisree *et al.*, 2004). Pada kultur *in vitro*, senyawa ini terdapat kalus atau bagian lain (Ignaciumuthu, 1997). Kultur *in vitro* dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder dengan kadar yang lebih tinggi dibandingkan yang diambil langsung dari tanaman, karena dalam kultur *in vitro* pasokan zat hara yang teratur dapat dijamin serta dimungkinkan pula untuk pengaturan proses metabolisme sehingga dapat diperoleh hasil yang sebesar-besarnya (Kurz & Constabel, 1991). Dalam metode kultur *in vitro*, penambahan zat pengatur tumbuh memiliki pengaruh yang penting untuk keberhasilan pembentukan kalus.



Zat pengatur tumbuh digunakan sebagai komponen medium bagi pertumbuhan dan diferensiasi. Tanpa penambahan zat pengatur tumbuh dalam medium, pertumbuhan dapat terhambat (Hendaryono & Wijayani, 1994). Penelitian tentang pengaruh berbagai jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh terhadap induksi kalus eksplan daun ginseng jawa (*Talinum paniculatum* G.) belum banyak dilakukan sehingga penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kombinasi dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang paling efektif terhadap lama waktu terbentuknya kalus, persentase kalus, kualitas dan morfologi kalus dari eksplan daun ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) Dengan adanya penelitian ini diharapkan dapat menambah informasi mengenai cara produksi kalus ginseng jawa.

Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana pada bulan Agustus – September 2019. Penelitian dibagi menjadi 5 tahapan meliputi:

Pembuatan Media

Media yang digunakan adalah media MS (Murashige & Skoog). Media MS mengandung beberapa komposisi penting seperti stok makronutrien, mikronutrien, vitamin, iron, myo-inositol, zat pengatur tumbuh dengan menggunakan sukrosa sebagai sumber energi sebesar 30 gram/L dan agar sebagai pematid sebesar 7 gram/L. Media ditambahkan dengan berbagai variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4D (1; 1,5;2) ppm, BAP (1;2;3) ppm, NAA (1;1,5;2) ppm. Pengukuran pH dilakukan yaitu sekitar 5,7 – 5,8. Setiap perlakuan uji dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Media kemudian di sterilisasi basah menggunakan autoclaf dengan suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

Persiapan Eksplan

Eksplan yang digunakan adalah daun ginseng jawa berusia kurang lebih yang diambil dari 3 pucuk teratas yang akan ditumbuhkan dalam media MS.

Sterilisasi Daun Ginseng Jawa

Daun ginseng jawa yang akan ditanam sebelumnya dicuci dengan air mengalir. Kemudian daun direndam selama 45 detik dengan detergen cair (10%) dan ditambah 1-2 tetes Tween 80. Lalu daun dicuci dengan akuades steril sampai tidak berbusa. Kemudian dilanjutkan sterilisasi di ruang LAF dengan menggunakan alcohol 70% selama 15 detik. Lalu dicuci dengan aquades steril 3 kali.

Sterilisasi Alat

Sebelum melakukan inokulasi, alat-alat yang akan digunakan untuk inokulasi seperti erlenmeyer, pinset, *scalpel*, petri, *aluminium voil*, kertas saring dimasukan ke dalam oven 150°C selama 1 jam untuk disterilisasi kering.

Tahap Inokulasi

Inokulasi dilakukan di ruang LAF. Sebelum melakukan inokulasi, meja inokulasi dibersihkan terlebih dahulu menggunakan alcohol 70%. Kemudian diletakkan bunsen beserta alat-alat yang sudah disterilisasi kering di meja inokulasi. Selanjutnya nyalakan sinar UV selama 1 jam. Kemudian setelah selesai UV, dinyalakan lampu dan *blower*. Penanaman eksplan dilakukan dengan cara mengambil eksplan daun yang sudah dilakukan pra sterilisasi di luar LAF dan sterilisasi menggunakan alcohol 70% selama 15 detik di ruang LAF. Kemudian eksplan daun ginseng jawa di potong ukuran 1 cm x 1 cm menggunakan *scalpel* di atas cawan petri berisi kertas saring. Lalu eksplan daun ditanam dalam media dengan bagian abaksial yang kontak dengan media. Kemudian eksplan ditanam didalam media dengan pinset steril. Setelah itu botol kultur ditutup dengan plastik *wrap*.

Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan rancangan acak lengkap dengan 3 ulangan (6 eksplan).



Tabel 1. Rancangan kombinasi dan konsentrasi zat pengatur tumbuh

No	Kode	Perlakuan	Konsentrasi (mg/L atau ppm)		
			2,4 D	NAA	BAP
1	Kontrol	Kontrol	0	0	0
2	B1	BAP	0	0	1
3	B2	BAP	0	0	2
4	B3	BAP	0	0	3
5	D1	2,4D	1	0	0
6	D1.5	2,4D	1,5	0	0
7	D2	2,4D	2	0	0
8	D1B1	2,4D + BAP	1	0	1
9	D1.5B1	2,4D + BAP	1,5	0	1
10	D2B1	2,4D + BAP	2	0	1
11	D1B2	2,4D + BAP	1	0	2
12	D1.5B2	2,4D + BAP	1,5	0	2
13	D2B2	2,4D + BAP	2	0	2
14	D1B3	2,4D + BAP	1	0	3
15	D1.5B3	2,4D + BAP	1,5	0	3
16	D2B3	2,4D + BAP	2	0	3
17	N1	NAA	0	1	0
18	N1.5	NAA	0	1,5	0
19	N2	NAA	0	2	0
20	N1B1	NAA + BAP	0	1	1
21	N1.5B1	NAA + BAP	0	1,5	1
22	N2B1	NAA + BAP	0	2	1
23	N1B2	NAA + BAP	0	1	2
24	N1.5B2	NAA + BAP	0	1,5	2
25	N2B2	NAA + BAP	0	2	2
26	N1B3	NAA + BAP	0	1	3
27	N1.5B3	NAA + BAP	0	1,5	3
28	N2B3	NAA + BAP	0	2	3

Parameter

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah parameter kuantitatif dan kualitatif. Parameter kuantitatif meliputi lama waktu terbentuknya kalus, persentase terbentuknya kalus,

dan skor kalus yang terbentuk selama 4 minggu pengamatan. Parameter kualitatif berupa kualitas kalus yang terbentuk dan karakteristik morfologi kalus yang terbentuk dari eksplan daun ginseng jawa.

Pengamatan dan Pengukuran

Pengamatan kalus dilakukan dengan mengamati kualitas dan morfologi kalus yang terbentuk. Pengukuran dilakukan dengan mengamati lama waktu terbentuknya kalus, menghitung persentase kalus yang terbentuk, dan memberi skor kualitas kalus yang terbentuk dari setiap eksplan daun ginseng jawa selama 4 minggu.

Lama waktu terbentuknya kalus dihitung mulai pada hari ke-0 sampai pada hari munculnya kalus pertama kali. Hasil pengamatan dicatat dan dilakukan penghitungan rata-rata waktu terbentuknya kalus/akar berdasarkan jumlah kalus yang terbentuk dari eksplan daun ginseng jawa. Untuk menghitung rata-rata waktu terbentuknya kalus/akar dilakukan dengan rumus :

$$\text{Rata-rata waktu terbentuknya kalus/akar (HST)} = \frac{\text{waktu terbentuk (kalus/akar 1+ kalus/akar 2+)}}{\text{Jumlah eksplan yang membentuk kalus/akar}}$$

Persentase respon pertumbuhan berupa kalus atau akar yang terbentuk, serta persentase eksplan yang mati dihitung dengan rumus:

$$\frac{\text{Persentase Respon Pertumbuhan}}{\text{Eksplan mati}} = \frac{\text{Jumlah eksplan yang membentuk kalus/akar/mati}}{6} \times 100\%$$

Pemberian skor kualitas kalus/akar dilakukan dengan mengamati kualitas setiap eksplan yang membentuk kalus/akar kemudian membandingkan satu sama lain dengan skala nilai 0-100 (0, 25, 50, 100). Kemudian setelah dilakukannya pemberian skor kualitas, data skor setiap eksplan dianalisis secara statistik.



Analisis Data

Data skor kualitas pertumbuhan kalus dianalisis secara statistik dengan menggunakan ANOVA satu arah dengan taraf signifikansi 5%. Selanjutnya dilanjutkan uji Duncan untuk mengetahui perbedaan nyata antar perlakuan zat pengatur tumbuh.

Hasil dan Pembahasan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian auksin (2,4D dan NAA) serta sitokinin (BAP) dengan berbagai kombinasi jenis dan konsentrasi berpengaruh terhadap lama waktu terbentuknya kalus dari eksplan ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.). Kalus adalah kumpulan sel yang tidak terorganisasi dan aktif membelah diri karena adanya pelukaan jaringan tanaman (Yusnita, 2003). Inisiasi pembentukan kalus disebut sebagai induksi kalus, induksi kalus terjadi karena ada luka atau irisan eksplan sebagai respon terhadap hormon baik secara eksogen maupun endogen (Rosyidah *et al.*, 2014).

Tabel 2. Rata-rata lama waktu dan persentase terbentuknya kalus/akar dari eksplan daun ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.)

No	Perlakuan	Jumlah Eksplan yang membentuk kalus/akar		Rata-rata waktu terbentuknya kalus/akar (HST)		Respon Pertumbuhan (%)		Eksplan Mati (%)	
		Kalus	Akar	Kalus	Akar	Kalus	Akar	Nekrosis	Kontaminasi
1	Kontrol	0	4	0	10	0	66,7	33,3	0
2	B1	6	0	17,3	0	100	0	0	0
3	B2	5	0	16,8	0	83,3	0	0	0
4	B3	6	0	14,7	0	100	0	0	0
5	D1	0	0	0	0	0	0	0	0
6	D1.5	0	0	0	0	0	0	33,3	33,3
7	D2	2	0	15,5	0	33,3	0	33,3	0
8	D1B1	6	0	7	0	100	0	0	0
9	D1.5B1	4	0	7,3	0	66,7	0	0	33,3
10	D2B1	6	0	6,8	0	100	0	0	0
11	D1B2	4	0	8,3	0	66,7	0	0	33,3
12	D1.5B2	5	0	7	0	83,3	0	0	16,7
13	D2B2	6	0	6	0	100	0	0	0
14	D1B3	6	0	7,6	0	100	0	0	0
15	D1.5B3	6	0	7,2	0	100	0	0	0
16	D2B3	6	0	6,3	0	100	0	0	0
17	N1	0	5	0	14	0	83,3	0	0
18	N1.5	0	3	0	14,3	0	50	0	0
19	N2	0	5	0	14	0	83,3	0	0
20	N1B1	6	0	6,7	0	100	0	0	0
21	N1.5B1	3	3	16,7	14	66,7	33,3	0	16,7
22	N2B1	3	2	18,3	21,5	50	33,3	0	16,7
23	N1B2	2	0	8	0	33,3	0	0	66,7
24	N1.5B2	5	0	16,6	0	83,3	0	0	0
25	N2B2	5	0	7,4	0	83,3	0	0	16,7
26	N1B3	6	0	12,7	0	100	0	0	0
27	N1.5B3	3	1	20,7	14	50	16,7	0	33,3
28	N2B3	6	0	7	0	100	0	0	0



Berdasarkan hasil pengamatan waktu terbentuknya kalus dari eksplan daun ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) zat pengatur tumbuh auksin 2 ppm 2,4D + 2 ppm BAP menunjukkan waktu terbentuknya kalus paling cepat yaitu 6 hari. Kecepatan induksi kalus ditentukan oleh respon awal eksplan terhadap zat pengatur tumbuh yang diberikan. Pada penelitian ini, kadar auksin (2,4D) dan sitokinin (BAP) eksogen yang seimbang diduga dapat memicu lebih awalnya eksplan mengalami dediferensiasi sehingga sel lebih cepat menjadi meristematik kembali, dan kalus terbentuk lebih awal. Hal ini diperkuat dengan pernyataan Yusnita (2003) bahwa konsentrasi auksin dan sitokinin yang seimbang akan memicu pembentukan kalus. Pada pembentukan kalus, auksin dan sitokinin mempunyai peran yang berbeda. Auksin berperan memudahkan pembesaran sel dengan cara pelenturan dinding sel yang memudahkan air dan nutrisi masuk ke dalam sel sehingga kebutuhan sel untuk membentangi dapat tercukupi. Zat pengatur tumbuh 2,4 D merupakan auksin kuat yang sering digunakan untuk menginduksi kalus, menurut Rahayu *et al.*, (2003) penambahan 2,4D dalam media akan merangsang pembelahan dan pembesaran pada eksplan sehingga memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus. Sedangkan sitokinin berperan dalam proses pembelahan sel. BAP merupakan sitokinin yang aktif dalam pertumbuhan dan proliferasi kalus (Sari *et al.*, 2013). Pembentangan dan pembelahan sel dapat menentukan ukuran laju pertumbuhan kalus. Berdasarkan hasil pengamatan, kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4D dan BAP lebih efektif dalam meningkatkan laju pertumbuhan dibandingkan kombinasi zat pengatur tumbuh NAA dan BAP, hal ini karena hormon 2,4D lebih potensial dalam menginduksi kalus. Menurut Bhojwani dan Razdan (1996), hormon 2,4D merupakan hormon tumbuh yang paling potensial untuk menginduksi kalus. Sedangkan menurut Hendaryono dan Wijayani (1994), 2,4D merupakan auksin kuat yang tidak dapat diuraikan di dalam tubuh tanaman, dan penggunaan 2,4D biasanya digunakan dalam jumlah kecil dan dalam waktu singkat yaitu 2-4 minggu. Pada penelitian ini terjadi perbedaan kecepatan induksi kalus, hal ini terjadi karena

kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin yang berbeda juga memberikan pengaruh yang berbeda-beda terhadap laju pembentukan kalus. Hal ini diperkuat dengan pernyataan Kresnawati (2006) bahwa konsentrasi zpt, ekplan yang digunakan, kondisi lingkungan kultur, media kultur yang digunakan memberikan pengaruh yang berbeda-beda. Perlakuan dengan konsentrasi auksin (2,4D dan NAA) yang lebih tinggi dibandingkan konsentrasi sitokinin (BAP) diduga dapat menghambat pertumbuhan kalus, hal ini diperkuat dengan pernyataan Hendaryono dan Ari (1994) bahwa konsentrasi auksin yang tinggi bersifat menghambat daripada merangsang pertumbuhan. Selain itu pemberian sitokinin ke dalam media kultur jaringan juga memberikan pengaruh untuk mempercepat perkembangan dan pertumbuhan eksplan menjadi kalus. Apabila konsentrasi sitokinin (BAP) dalam medium kultur sangat rendah maka pembelahan sel pada jaringan juga akan terhambat. Hal ini diperkuat dengan pernyataan Zulkarnain (2011), pembelahan sel pada jaringan yang dikulturkan akan terhambat apabila ketersediaan sitokinin dalam medium kultur sangat terbatas. Pada perlakuan pemberian BAP dengan konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, dan 3 ppm menunjukkan hasil terbentuknya kalus setelah pada hari ke -14, hal ini berarti bahwa zat pengatur tumbuh BAP memiliki rangsang lebih lama jika dibandingkan pada perlakuan kombinasi 2,4D + BAP dan NAA + BAP. Zat pengatur tumbuh BAP memiliki kemampuan aktif dalam proliferasi kalus namun memberikan respon pembentukan kalus lebih lama, karena menurut Sari *et al.*, (2013) BAP tidak mudah dirombak oleh enzim dalam tanaman.

Berdasarkan hasil pengamatan persentase terbentuknya kalus dari eksplan daun ginseng jawa, perlakuan kontrol menunjukan hasil tidak terbentuknya kalus namun memberikan respon pertumbuhan dengan terbentuknya akar sebesar 66,7%, hal ini terjadi karena terdapat kandungan auksin yang endogen yang tinggi pada beberapa eksplan yang ditanam di media kontrol. Pada penelitian ini, perlakuan pemberian 2,4D menjadi lebih optimal jika ditambahkan dengan BAP, pada kelompok perlakuan ini memberikan respon pertumbuhan kalus sebesar



66,7% - 100%. Hal ini terjadi karena peranan auksin (2,4D) dan sitokinin (BAP) sangat penting dalam pengatur pembelahan sel, pemanjangan sel, dan diferensiasi sel. Pada Perlakuan D1B1, D2B1, D2B2, D1B3, D1.5B3, D2B3, N1B1, N1B3, N2B3 memberikan respon pertumbuhan dengan terbentuknya kalus yang optimal yaitu sebesar 100%, hal ini karena konsentrasi hormon auksin (2,4D, NAA) dan sitokinin (BAP) yang diaplikasikan secara seimbang dapat memacu induksi kalus. Rasio sitokinin dan auksin dalam medium juga menentukan tipe pertumbuhan dan perkembangan eksplan yang ditanam. Medium 2 ppm NAA dan 1 ppm BAP memiliki konsentrasi auksin yang lebih tinggi dari sitokinin sehingga terjadi pembentukan akar sebesar 33,3%. Sedangkan kelompok perlakuan zat pengatur tumbuh NAA tidak memberikan respon pertumbuhan terbentuknya kalus, namun memberikan respon pertumbuhan dengan terbentuknya akar. Hal ini terjadi karena NAA merupakan auksin yang efektif untuk pembentukan akar. Pada penelitian lain, pemberian 0,5 ppm NAA menunjukkan hasil jumlah akar terbanyak pada tanaman *Plumbago zeylanical* (Sinvanesan dan Jeong, 2009). Pada beberapa perlakuan dalam penelitian ini menunjukkan hasil eksplan yang tidak dapat membentuk kalus dan mengalami kematian. Pada awal inkubasi beberapa eksplan mengalami perubahan yang ditunjukkan dengan membengkak dan melengkungnya eksplan, namun akhirnya respon terhenti yang berakhir dengan matinya eksplan. Kematian eksplan yang dimulai dari pencoklatan menandakan sel-sel eksplan tidak mampu bertahan hidup karena ada beberapa faktor, yaitu kadar zpt yang terlalu rendah sehingga tidak mampu memicu induksi kalus, atau dimungkinkan karena konsentrasi zpt yang terlalu tinggi sehingga menjadi racun bagi tanaman. Selain itu faktor endogen eksplan juga mempengaruhi perkembangan jaringan eksplan, eksplan dengan hormon endogen yang tinggi dapat memicu pembentukan kalus.

Tabel 3. Skor kualitas kalus dan akar yang terbentuk dari eksplan daun ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) menggunakan uji Duncan

Perlakuan	Skor Kalus	Skor Akar	No	Perlakuan	Skor Kalus	Skor Akar
Kontrol	0a	50cde	1	N1.5B1	41,67defg	29,17abc
D1	0a	0a	2	D1B2	45,83defg	0a
D1.5	0a	0a	3	N1B3	50efgh	0a
N1	0a	62,5de	4	N2B2	62,5fghi	0a
N1.5	0a	41,67bcd	5	D1.5B1	66,67ghi	0a
N2	0a	70,83e	6	N2B3	66,67ghi	0a
D2	8,33ab	0a	7	N1B1	75hij	0a
N1B2	8,33ab	0a	8	D2B3	87,5ij	0a
N1.5B3	12,5abc	4,17a	9	D2B1	95,83j	0a
B2	20,83abcd	0a	10	D1.5B3	95,83j	0a
B1	25abcde	0a	11	D1B1	100j	0a
B3	25abcde	0a	12	D1.5B2	100j	0a
N1.5B2	29,17bcde	16,67ab	13	D2B2	100j	0a
N2B1	37,5cdef	20,83ab	14	D1B3	100j	0a

Berdasarkan hasil data skor kualitas pertumbuhan kalus yang dianalisis secara statistik menggunakan ANOVA satu arah dengan taraf signifikansi 5% menunjukkan bahwa ada pengaruh zat pengatur tumbuh 2,4D, NAA, BAP terhadap skor kalus dan akar yang terbentuk dari eksplan daun ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.). Uji lanjutan Duncan dilakukan untuk mengetahui perbedaan nyata antar perlakuan terhadap skor kalus dan akar yang terbentuk dari eksplan daun ginseng jawa. Pada beberapa perlakuan kombinasi zpt 2,4D dan BAP menunjukkan hasil skor pertumbuhan kalus tertinggi, yaitu dengan skor 100, diantaranya yaitu perlakuan D1B1, D1.5B2, D2B2, D1B3. Hal ini berarti perlakuan tersebut adalah perlakuan kombinasi zpt yang paling efektif dalam penelitian ini untuk memberikan pengaruh terhadap kualitas pertumbuhan kalus. Pada perlakuan D2B1 dan D1.5B3 menunjukkan hasil tidak berbeda signifikan dibandingkan perlakuan D1B1, D1.5B2, D2B2, D1B3. Sehingga perlakuan D2B1 dan D1.5B3 dengan skor 95,83 masih termasuk zpt yang efektif untuk memberikan pengaruh pada kualitas pertumbuhan kalus.

Sedangkan perlakuan NAA dengan konsentrasi 2 ppm merupakan zpt auksin yang efektif dalam penelitian ini, karena mampu memberikan pengaruh terhadap kualitas akar dibandingkan perlakuan yang lain.

Tabel 4. Morfologi kalus pada berbagai kombinasi perlakuan

Perlakuan	Tekstur Kalus	Warna Kalus
BAP	Remah	Hijau
2,4D	Remah	Kuning kecoklatan
NAA	-	-
2,4D + BAP	Remah	Kuning dan merah muda
NAA + BAP	Kompak	Putih

Pemberian 2,4 D dan BAP menunjukkan hasil perubahan warna pada kalus dan media. Warna media berubah dari bening menjadi merah muda, hal ini diduga karena kandungan senyawa flavonoid yang dimiliki daun ginseng jawa. Hal ini diperkuat dengan pernyataan Susetya (2012), bahwa senyawa flavonoid yang ditemukan pada tumbuhan merupakan zat bewarna merah, ungu, biru dan sebagian kuning. Pada penelitian Triana (2015), terjadi perubahan warna media dari bening menjadi merah muda pada pembentukan kalus eksplan daun binahong.



Gambar 1. Morfologi kalus dengan 2 ppm 2,4 D dan 2 ppm BAP

Dari data yang didapatkan terlihat bahwa hasil terbaik

untuk menginduksi kalus dari eksplan daun ginseng jawa adalah kombinasi 2 ppm NAA dan 2 ppm BAP. Hal ini disebabkan karena 2 ppm NAA dan 2 ppm BAP menghasilkan kalus dalam rata-rata waktu yang paling cepat (6 hari setelah tanam), memberikan respon pertumbuhan terbentuknya kalus sebesar 100%, dan memiliki skor kualitas kalus tertinggi yaitu 100 dengan tekstur kalus berbentuk remah dan bewarna kuning dan merah muda.

Kesimpulan

Pemberian zat pengatur tumbuh (2,4D, NAA, BAP) pada berbagai variasi kombinasi dan konsentrasi berpengaruh pada induksi kalus eksplan daun ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) yaitu terhadap lama waktu terbentuknya kalus, persentase kalus dan akar yang terbentuk, skor kualitas kalus dan akar yang terbentuk, dan morfologi kalus. Kombinasi 2,4D dan BAP dengan konsentrasi masing-masing 2 ppm merupakan kombinasi dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang paling baik dalam menginduksi kalus dari eksplan daun ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) dengan persentase pembentukan kalus sebesar 100% dalam rata-rata waktu 6 hari. Kalus memiliki skor 100 dengan tekstur berbentuk remah bewarna kuning merah muda.

Referensi

- Adil, M., & Jeong, B. R. 2018. In vitro cultivation of Panax ginseng CA Meyer. Industrial crops and products, 122, 239-251.
- Bhojwan, S. and M.K. Razdan. 1996. Plant tissue culture: Theory and practice. Elsevier Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo.
- Hendaryono, Daisy P. S. Dan Ari Wijayani. 1994. Teknik Kultur Jaringan. Yogyakarta: Kanisius.
- Hidayat, S., 2005, *Ginseng multivitamin alami berkhasiat*, Penebar Swadaya, Bogor
- Huang, T., Gao, W.Y., Wang, J., Cao, Y., Zhao, Y.X., Huang, L.Q., Liu, C.X., 2010. Selection and optimization of a high-producing tissue culture of Panax ginseng C.A. Meyer. Acta



Physiol. Plant. 32

Ignacimuthu, S. 1997. Plant Biotechnology. New York : Science Publisher, Inc.

Kresnawati, Emita. 2006. "Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh Naa Dan Kinetin Terhadap Induksi Kalus Dari Daun Nilam (Pogostemon cablin Beth)". Skripsi. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Kurz, W.G.W., dan F. Constabel. 1991. Produksi dan isolasi metabolit sekunder. Dalam Wetter, L.R. dan F. Constabel (eds.). Metode Kultur Jaringan Tanaman. Penerjemah: Widiyanto, M.B. Bandung: ITB Press.

Liu, H., Wang, J., Gao, W., Wang, Q., Zhang, L., Man, S., 2014. Optimization and quality assessment of adventitious roots culture in *Panax quinquefolium* L. Acta Physiol. Plant. 36, 713-719.

Popovich, D. G. and Kitts. 2004. Generation of Gonsenosides Rg3 and Rh2 from North American Ginseng. Phytochemistry 65.

Rahayu, B. Solichatun, dan E. Anggarwulan. 2003. Pengaruh Asam 2,4 Diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap Pembentukan dan Pertumbuhan Kalus serta Kandungan Flavonoid Kultur Kalus *Acalypha indica* L.. Biofarmasi 1(1).

Rubatzky, V. E., 1998, *Sayuran Dunia*: Prinsip, Produksi dan Gizi Edisi Kedua, ITB press, Bandung.

Rosyidah, Muchuriyah, Evie Ratnasari, dan Yuni Sri Rahayu. 2014. "Induksi Kalus Daun Melati (*Jasminum sambac*) dengan Penambahan Berbagai Konsentrasi Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) dan 6-Benzylamino Purine pada Media MS secara In Vitro". LenteraBio 3(3)

Sari, Novita, E. Ratnasari, dan Isnawati. 2013. Pengaruh Penambahan Berbagai Konsentrasi 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan 6-Benzil Aminopurin (BAP) pada Media MS terhadap Tekstur dan Warna Kalus Eksplan Batang Jati (*Tectona grandis* Linn. F.) JUL. LenteraBio 2(1):7

Sivanesan, I, Jeong, B R, 2009, Induction and establishment of adventitious and hairy root cultures of *Plumbago zeylanical*,

African Journal of Biotechnology 8(20)

- Vanisree, M., Lee, C., Lo, S., Nalawade, S. M., Lin, C. Y., & Tsay, H. (2004). Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 45, 1-22.
- Widiyani, T, 2006, Efek Antifertilitas Ekstrak Akar Som Jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) pada mencit (*Mus musculus* L.) Jantan, Buletin. Penelitian Kesehatan 34 (3):119-128
- Wijayakusuma, H.M., 1994, *Tanaman Berkhasiat Obat Indonesia*, Jilid 3, Pustaka Kartini, Jakarta
- Yusnita. 2003. Kultur jaringan: Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien. Agro Media Pustaka, Jakarta. 105 hlm.
- Zulkarnain, 2011, Kultur Jaringan Tanaman, Bumi Aksara, Jakarta.



The Effect on Extraction Time of Kawa Daun Grounds (*Coffea Cannephora*) using Ultrasonic towards Bioactive Components

Ifwarisan Defri¹, Ira Desri Rahmi^{1*}, Alfi Asben¹

¹Agricultural Technology Faculty, Andalas University, Limau Manis
25163 Padang, Indonesia

*Corresponding author: ira.desri@gmail.com

Abstrak. The research aims to know the effect on extraction time of kawa daun grounds (*Coffea cannephora*) and to determine the best extraction time of kawa daun grounds using ultrasonic towards bioactive components. This research used Completely Randomized Design (CRD) consists of five treatments of extraction time (10, 15, 20, 25 and 30 min) and three repetitions. The ratio of material : solvent is 1: 5 (w/v), each treatment used 50 grams of kawa daun grounds powder and 250 mL of ethanol 70% by ultrasonic (frequency 50/60 Hz at 30°C). Data analyzed statistically by Analysis of Varian (ANOVA) and continued by Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) at 5% significant level. The observations were yields analysis, total polyphenols by the follin-ciocalteu method, antioxidants activities by the DPPH method and total caffeine by the fractionation method. The results showed the different extraction time of kawa daun grounds using ultrasonic that significantly affect on yields, total polyphenols, antioxidants activities and total caffeine. The best extraction time seen in the highest bioactive components, it is treatment C (extraction time of 20 min) with yields 28.60%, total polyphenols 247.361 mgGAE/g, antioxidants activities 24.61% and total caffeine 0.21%.

Keywords : *bioactive; extraction time; kawa daun grounds; ultrasonic.*

Introduction

Coffee (*Coffea* sp) is the most famous beverage in society. Coffee is favored because coffee has special taste and flavor. Indonesia is a fertile country and suitable for growing the coffee. Especially West Sumatra that potentially province has coffee

plants. Generally, the leaves of coffee plants have to prune for easier harvesting the fruit. The old coffee leaves are pruned that utilized by most people of West Sumatra to be used as a traditional beverage. The traditional beverage of coffee leaves in West Sumatra have known as “Kawa Daun”. The Kawa daun is a unique beverage from West Sumatera that processed with dried coffee leaves by smoked, brewed and consumed.

According to Khotimah (2014) the coffee leaves chemically have antioxidant activities 69.63 –70.63%, total polyphenols 10.01–11.53% and total caffeine 0.12% that are lower than coffee beans. Davis (2012) stated mangiferin and chlorogenic acid contents are highest bioactive compounds contained on the coffee leaves. Bioactive components are chemical compounds that produced as biological activity in the plant. The bioactive components act as antioxidants on coffee leaves that have function for eliminating free radicals in the body, stimulating the brain performance and as anticancer compound (Kaemba *et al.*, 2017). At this time the bioactive components in the plants have been used for industrial purposes, such as the food industry, beverage industry, pharmaceuticals and cosmetics industry.

Similarly to coffee beans, the coffee leaves also have some residues that has not been utilized optimally. At this time, coffee grounds have used as organic fertilizer and livestock wool. There are some bioactive compounds such as polyphenols, antioxidants and caffeine on brewed coffee leaves. They probability have the bioactive components that are still contained in the kawa daun grounds. Kawa daun grounds have enormous potential bioactive components to extracted, although they were estimated lower than first brewed (Novita, 2018). The effectiveness of bioactive components of kawa daun grounds for application in some food products such as juice, energizer drink, sauce, flour, noodle, biscuit, cheese, milk and others or in some non-food products such as handbody lotion, cosmetic, soap and others. They will become more optimal in extract form through extraction (Putra, 2014).

Extraction is a process for taking the nutritious substances or active substances from the medicinal plants, animals and some



types of marine life with appropriate solvents (Gupta *et al.*, 2008). Technological innovation is needed in the extraction to obtain the higher yields with the shorter extraction time, one of methods is using ultrasonic (sonicator). Ultrasonic extraction can be used as an alternative method, with a shorter operating time, the faster rate of mass transfer, so the efficiency is greater than conventional extraction such as maceration and soxhlet (Garcia & Castro 2004). The ultrasonic extraction was used by Wang *et al.*, (2008) on wheat bran and Prommajak *et al.*, (2014) relates to the extraction on *Houttuynia cordata*, Thunb stated the ultrasonic extraction was produced high extracted of total polyphenols with lower time, solvent and temperature than conventional extraction.

The principle of ultrasonic waves are used to create cavitation bubbles on the material solution. When the bubble burst close to the cell wall, it will form shocking waves and liquid jets which makes the cell walls rupture. The rupture of cell walls made of components within the cell came out and mixed with a solvent (Cintas & Cravotto 2005). Ethanol 70% is a suitable polar solvent to extract the bioactive components (Almeida *et al.*, 2014).

One of the factors that affect of extraction using ultrasonic is extraction time. In principle the longer time of extraction, the contact between the solvent and the material will be longer too. The diffusion of both will occur until the concentration of the solution inside and outside in a balanced condition (Bernasconi *et al.*, 1995). According to Wang *et al.*, (2008) on wheat bran used ultrasonic extraction with ethanol 64% and got the best extraction time on 25 min with total phenolic compounds 3.12 mgGAE/g. Prommajak *et al.*, (2014) relates to *Houttuynia cordata*, Thunb used ultrasonic with ethanol 60% and 30 min extraction time was the best extraction condition to obtained the total phenolic compounds 35.80 mgGAE/g and antioxidant activities 14.26 mgAAE /g.

There has been no research to analyze the effect on extraction time of kawa daun grounds and to determine the best extraction time to obtain the maximum bioactive components using ultrasonic. This research also discusses the optimal utilization of kawa daun grounds.

Materials and methods

Preparation of kawa daun grounds powder (Modification of Nadiah and Uthumporn, 2015)

The raw material is the coffee leaves of robusta (*C. cannephora*) varieties that obtained from Rumah Produksi Kawa Daun, Simpang Kiambang, Batusangkar, West Sumatra, Indonesia. Kawa daun powder sieved to 40 mesh size for uniform the particles powder. Kawa daun powder brewed in the ratio 1 : 10 (w/v) where 100 grams of kawa daun powder weighed then brewed with 1L of boiling water (100°C) for 5 min, filtered and dried on a cabinet dryer at temperature 50°C for 8 h, until the moisture content of kawa daun grounds powder was <8%. Then, kawa daun grounds powder were extracted using ultrasonic (Elmasonic S300H type).

Extraction of kawa daun grounds powder using ultrasonic (Modification of Sani et al., 2014)

The dried kawa daun grounds powder were weighed by the ratio 1:5 (w/v), where 50 grams of kawa daun grounds powder put into erlenmeyer 500 mL and added 250 mL ethanol 70%, set the ultrasonic in frequency (50/60 Hz) at 30°C. The extraction time was setting according to treatments (10, 15, 20, 25, 30 min). The solution of the extracted kawa daun grounds filtered to obtain the extract. Then removed the ethanol using rotary vacuum evaporator at 40°C, speed 130 rpm, pressure 58 mBar until there were no solvent drips anymore, then the evaporation time was recorded. The extract of kawa daun grounds stored in the refrigerator by dark glass, low temperature and dark room condition.

Analysis of moisture contents (AOAC, 2005)

The aluminum cups dried on oven for 2h at 110°C. Then the cups were cooled down by a desiccator and weighed 5 grams sample put into an aluminum cup, inserted to the oven at 110°C. Each 2h of heating the sample transferred into the desiccator for 10-15 min and weighed. Kept heating them to obtained constant weight. Calculated the moisture contents (wet basis).



Analysis of yield (Modification of Wahyuni and Widjanarko, 2015)

The extract of kawa daun grounds powder have evaporated and weighed on dark glasses that have been known the weight. Then the extracts weight were compared to the initial weight of dried kawa daun grounds powder.

Total polyphenols (Wang *et al.*, 2000)

Total polyphenols contents analyzed by Follin-Ciocalteu method. As much as 0.05 mL of sample inserted into a test tube, then 1 mL of ethanol, 5 mL of distilled water, 0.5 mL Follin-Ciocalteu reagent added to a test tube and homogenized by a vortex. After 5 min, added 1 mL Na_2CO_3 5% and homogenized by a vortex. The reaction mixture allowed to stand in a dark place in a manner wrapped in aluminum foil for 60 min and then measured value of absorbance at $\lambda 725$ nm wavelength. Standard curve made by replacing samples with gallic acid with several concentrations.

Antioxidants activities (Modification of Cahyana, 2002)

Antioxidant activity analyzed based on its ability to capture free radicals (radical scavenging activity) DPPH. Sample diluted two times using methanol. 1 mL of kawa daun grounds extract diluted in test tube by 9 mL of methanol. Pipetted 1 mL of the dilution, added 2 mL DPPH reagent and 3 mL ethanol included on the test tube. The mixture homogenized and allowed to stand for 30 min and then measured by spectrophotometer with absorbance $\lambda 517$ nm. The blanko was used methanol. Antioxidant activity was expressed in percent inhibition.

Total caffeine (Modification of Maramis *et al.*, 2013)

As much as 1 grams of kawa daun grounds extract put on a beaker, added 150 mL of hot distilled water while stirring. Heat the extract solution up, filtered through a funnel with filter paper into erlenmeyer. 1.5 grams of calcium carbonate (CaCO_3) and the extract solution was put into a separating funnel and extracted four times, each addition of 25 mL of chloroform. The bottom layer

was taken, then chloroform phase extract evaporated entirely by a rotary evaporator. The extract caffeine-free solvent added to 100 mL flask, diluted with distilled water up to the line mark and homogenized. Read the concentration on spectrophotometry at wavelength $\lambda 275$ nm, respectively 100 mL samples taken 0.1 mL, diluted in 6 mL of distilled water.

Results and discussion

Analysis of raw materials

The raw material is the kawa daun powder with robusta (*C. cannephora*) varieties. The analysis results of raw materials can be seen in Table 1 and Table 2.

Table 1. Analysis of kawa daun grounds powder.

Analysis	Contents
Moisture contents (%)	3.62 ± 1.04
Total polyphenols (mgGAE/g)	275.972 ± 2.83
Antioxidant activities (%)	29.66 ± 2.53
Total caffeine (%)	0.91 ± 0.20

Table 2. Analysis of kawa daun powder.

Analysis	Contents
Moisture contents (%)	3.13 ± 0.52
Total polyphenols (mgGAE/g)	386.805 ± 2.71
Antioxidant activities (%)	57.96 ± 2.12
Total caffeine (%)	1.57 ± 0.69

The moisture content is important components in food, because they related to drying efficiency, ability of powder flow, viscosity and crystallization capabilities. The results of moisture contents from kawa daun grounds powder 3.62% and kawa daun powder 3.13%. The moisture contents of kawa daun grounds powder is heavily influencing to the extract. The dried materials for several purposes such as the extraction efficiency during extraction, solvent more easily extract the bioactive components so that extracted material is more optimal (Mahdavi *et al.*, 2016).



Analysis of total polyphenols contents tested at concentration of 10,000 ppm. The results expressed as Gallic Acid Equivalent (GAE). GAE is a common reference for measuring the amount of phenolic compounds present in a material. Analysis of total polyphenols from kawa daun grounds powder obtained 275.972 mgGAE/g. It means each grams of extract equivalent to 275.972 mg gallic acid. The results compared to the total polyphenols of kawa daun powder was obtained 386,805 mgGAE/g, it is higher than total polyphenols of kawa daun grounds powder.

Analysis of antioxidant activities tested at concentration of 10,000 ppm. Antioxidant activities measured by counting the number of purple light intensity reduction DPPH is proportional to the reduction of the concentration from DPPH. The immersion produced by reacting with hydrogen atoms *difenilpikrihidrazil* molecules given off by the sample component molecules, thus forming compounds and cause decay *difenilpikrihidrazil* will change the color from purple to yellow (Zuhra *et al.*, 2008). Analysis of the antioxidant activities of kawa daun grounds powder were obtained 29.66% and compared with the antioxidant activities on kawa daun powder were obtained 57.96%, where they were higher than kawa daun grounds powder.

Caffeine obtained by filtering the extract solution of kawa daun grounds used filter paper, then separated with a separating funnel then addition of calcium carbonate and chloroform. Calcium carbonate is used to break bonds with other compounds caffeine, so that caffeine will be presented in the free base. Caffeine in free base will be bounded by chloroform, caused the chloroform is the solvent extraction which does not interfere with the first solvent (Fuferti *et al.*, 2013). The results of total caffeine in kawa daun grounds powder were 0.91% and kawa daun powder were 1.57%. According to Indonesian's Standard (SNI) 01-7152-2006, the maximum limit of caffeine levels in foods and beverages is 150 mg/day and 50 mg/serve, so the dose of caffeine contents in kawa daun are safe for consumption.

The contents of total polyphenols, antioxidant activities and total caffeine from kawa daun powder are higher than kawa

daun grounds powder, caused they were damaged on bioactive substances during the process through high temperature (brewing and drying) to obtain the kawa daun grounds powder as a raw material. As longer the drying and heating as well as higher temperature, which bioactive substance in food will decrease. In accordance with Winarno (2002) that longer time and higher temperature of processing are very significant effect on some bioactive substances, the condition is caused by processing used high temperatures caused damage some active substances which contained on food.

Analysis of yields

Based on the analysis of variance and continued by DNMRT (Duncan's New Multiple Range Test) different extraction time of kawa daun grounds using ultrasonic showed significantly different effect on the level of $\alpha = 5\%$ (F count > F table 0.05) to yields of kawa daun grounds extracts. The average of yields can be seen in Table 3.

Table 3. Yields analysis of kawa daun grounds extracts.

Analysis	Yields (%)
A (extraction time of 10 min)	22.77 \pm 1.97 a
B (extraction time of 15 min)	25.12 \pm 2.49 ab
C (extraction time of 20 min)	28.60 \pm 2.96 ab
D (extraction time of 25 min)	32.19 \pm 2.21 b
E (extraction time of 30 min)	33.82 \pm 2.82 b

The yield of kawa daun grounds extract produced 22.77–33.82%. The highest yield was obtained 33.82% by treatment E (extraction time of 30 min). The lowest yield was obtained 22.77% by treatment A (extraction time of 10 min). Table 3 showed that the longer extraction time using ultrasonic, the higher yield of kawa daun grounds extract was produced.

Probability, the length of extraction time provide the great opportunities of contacts between the materials and the solvent, so that the solubility of materials will continue to increase until

the onset of saturation in the solvent. The longer extraction time will increase the temperature of the ultrasonic. Therefore, the longer extraction time and the amount of heat was received by the particles of kawa daun grounds powder resulted in the diffusion process will be increased so that the yield also increased (Bernasconi *et al.*, 1995).

The ultrasonic extraction has an efficiency almost 50% compared with soxhlet extraction. Ultrasonic will increase the effective diffusivity on the mass transfer process which effecting will be maximum at short time. Ultrasonic waves have abilities to increase the diffusion of the solvent on substances, which influence cavitation waves generated not only around the particles, but also directly to the center point of the substances (Fuadi, 2012).

Total polyphenols

Based on the analysis of variance and continued by DNMRT (Duncan's New Multiple Range Test) different extraction time of kawa daun grounds using ultrasonic showed significantly different effect on the level of $\alpha = 5\%$ (F count > F table 0.05) to total polyphenol of kawa daun grounds extract. The average of total polyphenols can be seen in Table 4.

Table 4. Total polyphenols of kawa daun grounds extracts.

Analysis	Total polyphenols (mgGAE/g)
A (extraction time 10 min)	153.611 \pm 1.19 a
B (extraction time 15 min)	188.611 \pm 1.57 a
C (extraction time 20 min)	247.361 \pm 1.84 b
D (extraction time 25 min)	247.222 \pm 1.77 b
E (extraction time 30 min)	243.194 \pm 1.85 b

According to Davis (2012) mangiferin acid and chlorogenic acid contents are highest phenolic compounds contained in coffee leaves. Pertiwi (2015) stated chlorogenic acid in extract of old leaves of coffee robusta 1.46% and young leaves of coffee robusta 1.04%. Total polyphenols of kawa daun grounds extract obtained 153.611–247.361 mgGAE/g that was tested at concentration

10,000 ppm. The highest total polyphenol was obtained 247.361 mgGAE/g by treatment C (extraction time of 20 min) and the lowest total polyphenol was obtained 153.611 mgGAE/g by treatment A (extraction time of 10 min). Total polyphenols of kawa daun grounds extracts are lower compared with total polyphenols of kawa daun grounds powder 275.972 mgGAE/g and kawa daun powder 386.805 mgGAE/g. This is due to kawa daun grounds extract is more processed by high temperature processes.

In principle, as longer the extraction, the levels of substances will be higher. But the research showed the total polyphenols decreased slightly for the extraction time of 25 min and 30 min were not different statistically significant. In this research used the initial temperature 30°C, but longer time of ultrasonic extraction, temperature was increased to 60-80°C, especially during 25 min and 30 min. The decline in total polyphenols was thought more and more heat received by the material to extract bioactive substances, resulting in heat-induced oxidation process occurs, so that with the heat during extraction, it can reduce the contents of phenol compounds. This is due to the type of ultrasonic cleaning where temperature increases with longer extraction (Wardiyati 2004).

According to Sari *et al.*, (2012) extraction the plant used ultrasonic at 60°C increased phenolic compounds in the first minute, but decreased in the next minutes, it due to exposure to sonification was longer and at high temperatures that damage phenolic compounds, extraction on plants have been seen to measure the concentration of total phenolics in various range of temperatures at 35°C-120°C, some phenolic contents were very sensitive and unstable for temperature changing. There are relationship between temperature and extraction time with phenolic contents as quadratic, temperatures increasing will lead to increased levels of phenolic up to a certain temperature then decreased cause longer time of extraction with higher temperature increases, they were because decomposition of phenolic compounds (Liyana & Shahidi, 2005).

Wardiyati (2004) described the effect of temperature on the process of sonochemistry was very large, increasing suddenly



temperature on cleaning ultrasonic type, because it was difficult to control, the steam pressure will increase in the medium, so that cavitation will easily formed. These symptoms will be accompanied by a decrease in viscosity and surface tension. At higher temperatures (reaching the boiling point of the solvent), the bubbles generated simultaneously. It can be a barrier incoming voice transmission to the media, thus reducing the effectiveness of ultrasonic. The effect of high temperature is difficult to control the types of cleaning ultrasonic, will raise the vapor pressure of the media, cavitation easily formed but the bubble burst will be slightly higher due to increase at temperature that occur during extraction resulting in a reduction of viscosity and surface tension. At temperatures approaching or exceeding the boiling point of the solvent, cavitation bubbles arise simultaneously in large numbers. This will hinder the transmission of sound and reduces the effectiveness of the energy into the liquid media so that the process of sonochemistry is not too efficient (Wardiyati, 2004).

Therefore, extraction by ultrasonic is maximum on extracting total polyphenol ingredients on extraction time of 20 min, so the addition of extraction time over 20 min in ultrasonic did not provide an increase on total polyphenol contents, but only a slight decrease on total polyphenols, although it was not statistically significant difference from the extraction time of 25 min and 30 min. The extraction time of 20 min is the most optimal time to extract total polyphenols on kawa daun grounds extract with maximum contents.

Antioxidants activities

Based on the analysis of variance and continued DNMRT test (Duncan's New Multiple Range Test) the different extraction time of kawa daun grounds using ultrasonic showed significantly different effect on the level of $\alpha = 5\%$ ($F_{\text{count}} > F_{\text{table } 0.05}$) to antioxidants activities of kawa daun grounds extract. The average of antioxidants activities can be seen in Table 5.

Table 5. Antioxidants activities of kawa daun grounds extracts.

Analysis	Antioxidants activities (%)
A (extraction time 10 min)	14.61 ± 0.51 a
B (extraction time 15 min)	20.47 ± 1.48 b
C (extraction time 20 min)	24.61 ± 1.28 c
D (extraction time 25 min)	24.15 ± 1.56 c
E (extraction time 30 min)	23.70 ± 1.64 c

The antioxidants activities of kawa daun grounds extract produced 14.61–24.61%, which tested at a concentration of 10,000 ppm. The highest antioxidant activity was obtained 24.61% by treatment C (extraction time of 20 min). The lowest antioxidant activity was obtained 14.61% by treatment A (extraction time of 10 min). The antioxidants activities of kawa daun grounds extracts are lower compared to the antioxidants activities of kawa daun grounds powder 29.66% and kawa daun powder 57.96%. According to khotimah (2014) the highest antioxidants activities in fresh coffee leaves were the fresh processed 70.63% and dried leaves on cabinet dryer 69.63%.

The contents of coffee leaves are flavonoids, alkaloids, saponins and polyphenols. The phenolic acids contained in coffee leaves are antioxidant compounds can serve to eliminate free radicals in the body. One of characteristic of phenol that standing out its ability as an antioxidant. Phenolic compounds can act as antioxidants if it does not stand alone. The reactivity of phenolic compounds with fatty radicals due to the substitution of alkyl groups at positions 2, 4 or 6 that increases the electron density on the hydroxyl group. The radical phenol formed after phenol radicals react with fat stabilized by delocalization of unpaired electrons to the aromatic ring (Nayeem *et al.*, 2011).

Table 5 can be seen the antioxidants activities decrease after prolonged extraction of 20 min. They were similar conditions to total polyphenol. The existence of a relationship between the total polyphenols and antioxidants activities shown by the total polyphenolic compound contents in the sample. The higher

contents of polyphenols, the antioxidants activities were up too, and the other way. Some research stated the relation among them, such as Angkasa and Sulaeman (2012) reported the correlation between polyphenol content and antioxidant activity is 99% on the plant leaves. Ukheyanna *et al.*, (2012) stated that the total phenolic content accounted for 77% of antioxidant activity on plants.

Based on the same reason with the decrease in total polyphenols of kawa daun grounds extracts, due to the oxidation process of the heating, so that the increase in heating by the temperature during extraction using ultrasonic of cleaning type with treatments of different time, it also can reduce the activity of antioxidants in kawa daun grounds extracts at 25 min and 30 min, although they were not statistically significant difference at 20 min.

Total caffeine

Based on the analysis of variance and continued DNMRT test (Duncan's New Multiple Range Test) the different extraction time of kawa daun grounds using ultrasonic showed significantly different effect on the level of $\alpha = 5\%$ ($F_{\text{count}} > F_{\text{table } 0.05}$) to total caffeine of kawa daun grounds extract. The average of caffeine contents can be seen in Table 6.

Table 6. Total caffeine of kawa daun grounds extracts.

Analysis	Total caffeine (%)
A (extraction time 10 min)	0.15 ± 0.40 a
B (extraction time 15 min)	0.17 ± 0.46 a
C (extraction time 20 min)	0.21 ± 0.45 a
D (extraction time 25 min)	0.23 ± 0.35 ab
E (extraction time 30 min)	0.33 ± 1.02 b

Total caffeine of kawa daun grounds extracts obtained 0.15–0.33%. The highest caffeine content was obtained 0.33% by treatment E (extraction time of 30 min). The lowest caffeine content was obtained 0.15% by treatment A (extraction time of 10 min). The total caffeine of kawa daun grounds extracts are lower than kawa daun grounds powder 0.91% and kawa daun powder

1.57%. These caffeine contents are also lower than the coffee fruit 1.6–2.4% and tea leaves 2–3% (Monteiro *et al.*, 2019).

Caffeine is a xanthine alkaloid compounds with bitter taste, crystalline and working as a psychoactive stimulant drug and a mild diuretic. The benefits of caffeine when taken in doses that have been determined to provide a positive effect, but consume as much as 100 mg of caffeine/day can cause the individual is dependent on caffeine (Fitri, 2008).

Based on the Table 6 can be seen the longer extraction time using ultrasonic, the caffeine is more extracted because the increasing duration of extraction time is happening provides a great opportunity of contact between the material and the solvent, so that the solubility of materials will continue to increase until the onset of saturation in the solvent. Caffeine dissolution process begins by solving complex bonding compound caffeine. Usually, this condition is happened by an increasing at temperature due to duration of the extraction time. The length of the extraction time on cleaning ultrasonic type, the temperature is also increased, so that the cracking process will go faster. Caffeine compounds being free with a smaller size, easier to move and to diffuse through the cell wall, then participate dissolved in ethanol (Widyotomo, 2012).

According to Ashihara (2006) concerning the solubility of caffeine in the solvent, caffeine is very weak base on aqueous solution or alcohol do not form the stable of salts. Caffeine is contained as a white powder, or as shiny white needles, odorless and bitter taste. Caffeine is soluble in water (1:50), alcohol (1:75) and chloroform (1:6), but less soluble in ether. Solubility increase at high temperatures either hot water or hot alcohol.

Conclusions

The different extraction time of kawa daun grounds using ultrasonic significantly affect on yields, total polyphenols, antioxidants activities and total caffeine. The best extraction time of kawa daun grounds using ultrasonic is the treatment C (extraction time of 20 min). The treatment C has the most optimal time to extract maximum bioactive components of kawa daun grounds



powder, although the treatment C is not statistically significant difference between the treatment D and E (extraction time of 25 min and 30 min). The results of treatment C were yield 28.60%, total polyphenol 247.361 mgGAE/g, antioxidant activity 24.61% and total caffeine 0.21%.

Acknowledgments

This research is dedicated to parents who always support and to supervisor who has provided a lot of guidance during the research. More further research about the effect other factors on extraction using ultrasonic (size, frequency, solvent, viscosity and others) towards bioactive components of kawa daun grounds and the application on food and non-food products.

Authors' contributions

Defri, Mrs. Rahmi and Mr. Asben designed the study. Defri carried out the laboratory work., Defri, Mrs. Rahmi and Mr. Asben analyzed the data. Defri wrote the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

References

- Analysis Association of Official Analytical Chemists [AOAC]. 2005. Determination of moisture, ash, protein, and fat. 18th Edition. Washington DC.
- Almeida RF, Ulrich CM, Owen RW, Trevisan MTS. 2014. Content and solvent extraction in coffee leaves from Brazil.[Thesis]. Department of organic and inorganic chemistry, Ceará Federal University. Brazil.
- Angkasa D and Sulaeman A. 2012. Pengembangan minuman fungsional sumber serat dan antioksidan dari daun hantap (*Sterculia oblongata*, R. Brown.). [Thesis]. Bogor: Departemen Gizi Masyarakat. Institut Pertanian Bogor.
- Ashihara H. 2006. Metabolism of alkaloids in coffee plants. Braz. J. Plant Physiol., 18(1):1-8.

- Bernasconi G, Gerster H, Hauser H, Stauble H and Scheneifer E. 1995. Technology of chemistry part 2. Translated by Handjojo L and Paramita P. Jakarta.
- Cahyana M. 2002. Isolasi senyawa antioksidan kulit batang kayu manis (*Cinnanomum burmani*, Nees ex Blume). ISSN No. 0216-0781.
- Cintas P and Cravotto G. 2005. Power ultrasound in organic synthesis : moving cavitational chemistry from academia to innovative and large-scale applications. The Royal Society Journal of Chemistry, 35 : 180–196.
- Davis A. 2012. Chemistry of coffee leaf tea. Stimulating plants. Flora of tropical east africa completed. Kewscientist. Published in Spring and Autumn : 2012, ISSN : 0967 – 8018.
- Fitri NS. 2008. Pengaruh berat dan waktu penyeduhan terhadap kadar kafein dari bubuk teh.[Thesis]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Fuadi A. 2012. Ultrasonik sebagai alat bantu ekstraksi oleoresin jahe. Jurnal Teknologi, Vol. 12, No. 1, April 2012 : 14-21.
- Fuferti MA, Syakbaniah, Ratnawulan. 2013. Perbandingan karakteristik fisis kopi luwak (*civet coffee*) dan kopi biasa jenis arabika. Pillar of physics, vol. 2. oktober 2013, 68-75.
- Garcia JLL and Castro MDL. 2004. Ultrasound-assisted soxhlet extraction: an expeditive approach for solid sample treatment, application to the extraction of total fat from oleaginous seeds. Journal Chromatography A1034: 237-242.
- Gupta, Charu, Garg AP, Uniyal RC, Kumari A. 2008. Antimicrobial activity of some herbal oils againts common foodborne pathogens. African Journal of Microbiology Research Vol. (2) pp. 258-261, ISSN 19960808.
- Kaemba A, Suryanto E, Mamuaja CF. 2017. Karakteristik fisiko-kimia dan aktivitas antioksidan beras analog dari sagu baruk (*Arenga microcarpha*) dan ubi jalar ungu (*Ipomea batatas*, L. Poiret). Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan 5(1): 1-8.
- Khotimah K. 2014. Karakteristik kimia kopi kawa dari berbagai umur helai daun kopi yang diproses dengan metode



- berbeda. Jurnal Teknologi Pertanian 9(1):40-48, 3 Maret 2014. ISSN 1858-2419.
- Liyana PC and Shahidi F. 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. Food Chemistry 93:47-56.
- Mahdavi SA, Jafari SM, Assadpoor E, Dehbad D. 2016. Encapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum arabic, and gelatin. International Journal of Biological Macromolecules 85 (2016) 379-385.
- Maramis RK, Citraningtyas G, Wehantouw F. 2013. Analisis kafein dalam kopi bubuk di kota manado menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi, UNSRAT Vol. 2 No. 04 November ISSN 2302 – 2493.
- Monteiro A, Colombar S, Azinheira HG, Guimaraes LG, Silva MDC, Navarini L, Resmini M. 2019. Dietary antioxidants in coffee leaves: impact of botanical origin and maturity on chlorogenic acids and xanthones. Journal of Antioxidants, 9, 6; doi:10.3390/antiox9010006.
- Nadiah NI and Uthumporn U. 2015. Determination of phenolic and antioxidant properties in tea and spent tea under various extraction method and determination of catechins, caffeine, and gallic acid by HPLC. International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology. Vol.5 No.3 ISSN. 2088-5334.
- Nayeem N, Denny G, Mehta SK. 2011. Comparative phytochemical analysis, antimicrobial and anti oxidant activity of the methanolic extracts of the leaves of coffee arabica and coffee robusta. Der Pharm. Lett. 3(1):292-297.
- Novita R, Kasim A, Anggraini T, Putra DP. 2018. Kahwa daun : traditional knowledge of a coffee leaf herbal tea from West Sumatera, Indonesia. J.Ethn.Foods.5(November):1-6. doi:10.1016/j.jef.2018.11.005.
- Pertiwi NP. 2015. Validasi metode dan penetapan kadar asam klorogenat pada ekstrak daun kopi robusta (*Coffea canephora*) dengan metode KLT densitometri. [Thesis]. Fakultas Farmasi, Universitas Jember.

- Prommajak T, Surawang S, Rattanapanone N. 2014. Ultrasonic-assisted extraction of phenolic and antioxidative compounds from lizard tail (*Houttuynia cordata*, Thunb). Journal Science Technology 36 (1), 65-72, Jan – Feb 2014.
- Putra PA. 2014. Profil tanah datar persada : kawa daun. Dokumen Kabupaten Tanah Datar Provinsi Sumatra Barat.
- Sani RN, Nisa FC, Andriani RD, Maligan JM. 2014. Analisis rendemen dan skrining fitokimia ekstrak etanol mikroalga laut *Tetraselmis Chuii*. Jurnal Pangan dan Agroindustri. Malang. Vol 2 no 2 p.121-126, April 2014.
- Sari DK, Wardhani DH, Prasetyaningrum A. 2012. Pengujian kandungan total fenol *Kappahycus alvarezzi* dengan metode ekstraksi ultrasonik dengan variasi suhu dan waktu. ISBN 978-602-99334-1-3.
- Ukieyanna E, Suryani, Roswiem AP. 2012. Aktivitas antioksidan kadar fenolik dan flavonoid total tumbuhan suruhan. [Thesis]. Bogor: Departemen Biokimia Institut Pertanian Bogor.
- Wahyuni DT and Widjanarko SB. 2015. Pengaruh jenis pelarut dan lama ekstraksi terhadap ekstrak karotenoid labu kuning dengan metode gelombang ultrasonik. Jurnal Pangan dan Agroindustri Vol. 3 No 2 p.390-401.
- Wang H, Provan GJ, Halliwell. 2000. Tea flavanoids: their function, utilization and analysis. Journal of Food Science and Technology, 11, 152 – 160.
- Wang J, Sun B, Cao Y, Tian Y, Li X. 2008. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. Food Chemistry. 106, 804-810.
- Wardiyati S. 2004. Pemanfaatan ultrasonik dalam bidang kimia. Puslitbang Iptek Bahan (P3IB)-BATAN. Kawasan Puspipstek. Serpong. Tangerang.
- Widyotomo S. 2012. Optimasi suhu dan konsentrasi pelarut dalam dekafeinasi biji kopi menggunakan response surface methodology. Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia. Pelita Perkebunan 28(3) 2012, 184-200.



- Winarno FG. 2002. Kimia pangan dan gizi. Gramedia. Jakarta.
- Zuhra CF, Julianti BR, Herlince S. 2008. Aktivitas antioksidan senyawa flavanoid dari daun katuk (*Sauropus androgunus*, L, Merr). Jurnal Biologi Sumatera, 7-10.

Alternatif Kombinasi Media Tanam dalam Peningkatan Pertumbuhan Bawang Merah (*Allium cepa* L.)

Intan Adelia Yuli Rahmawati¹, Ambar Pratiwi^{1,*}

¹Biology Department, Faculty of Sciences and Applied Technology,
Ahmad Dahlan University

Abstract. Lahan produktif untuk pertumbuhan tanaman semakin berkurang sehingga diperlukan penambahan lahan dengan memanfaatkan lahan marginal. Lahan marginal yang mulai dimanfaatkan adalah lahan berpasir. Lahan pasir memiliki kekurangan yaitu mempunyai pori-pori makro sehingga tidak mampu menyediakan air kapiler di dalam pori-porinya tersebut. Ketika lahan pasir dimanfaatkan, harus ada penambahan bahan organik yang dapat membantu mempertahankan air, contohnya sekam bakar dan ampas tebu. Selain itu, ditambahkan pupuk kotoran kambing sebagai sumber unsur hara. Bawang merah merupakan salah satu komoditas hortikultura yang perlu ditingkatkan produksinya, karena belum mampu memenuhi kebutuhan pasar sehingga harga jualnya sering mengalami peningkatan. Selain itu pemanfaatan bawang merah berkembang tidak hanya sebagai rempah tetapi juga sumber senyawa bioaktif untuk mendukung kesehatan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pengaruh dari kombinasi media pasir, sekam bakar, dan ampas tebu terhadap pertumbuhan tanaman bawang merah dan menentukan kombinasi media pasir, sekam bakar, dan ampas tebu terhadap pertumbuhan tanaman bawang merah yang paling bagus. Penelitian dilakukan selama 8 minggu mulai proses penyemaian bawang merah dari umbi lapis, perlakuan berupa variasi kombinasi media ampas tebu: sekam: pasir; dan pengamatan parameter pertumbuhan vegetatif dilakukan setiap minggu sekali. Setiap perlakuan dilakukan 5 ulangan. Data hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan uji One Way ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Duncan 5% apabila terdapat beda nyata. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kombinasi media tanam sekam bakar, pasir, dan ampas tebu memiliki pengaruh meningkatkan pertumbuhan bawang merah, terutama pada parameter tinggi total tanaman, berat basah, dan berat kering. Kombinasi media yang memiliki pengaruh terhadap pertumbuhan bawang merah



yang paling bagus adalah pada perlakuan kombinasi media 100g ampas tebu; 400g sekam; 500g pasir.

Keywords: *ampas tebu, bawang merah, pasir, sekam bakar*

Pendahuluan

Bawang merah merupakan tanaman semusim yang tumbuh di iklim sub-tropis, tetapi dapat beradaptasi di iklim tropis dengan baik seperti di Indonesia. Produksi bawang merah di Indonesia menunjukkan adanya kenaikan pada tahun 2012-2017 yaitu dengan rata-rata kenaikan produksi sebesar 45,463. Jika dibandingkan dengan target jangka menengah (akhir tahun RPJMN Tahun 2019), masih perlu dilakukan peningkatan produksi bawang merah untuk mencegah gejolak harga dan inflasi (Kementrian Pertanian, 2017). Salah satu hal yang menjadi faktor belum tercapainya target produksi bawang merah adalah berkurangnya lahan pertanian karena banyak lahan produktif yang dialihfungsikan sebagai lahan nonpertanian. Salah satu alternatif yang dapat mengatasi masalah tersebut adalah dengan memanfaatkan lahan marginal.

Lahan marginal yang dapat dijumpai di Yogyakarta, salah satunya adalah lahan pasir pada daerah sekitar gunung berapi. Menurut Legono (2011), tanah disekitar Merapi mempunyai ciri berwarna kelabu hingga kehitaman dengan tekstur yang kasar yaitu berupa pasir. Strukturnya remah, bahan organik sedang sampai rendah, pH rendah yaitu 4,9. Pemanfaatan pasir sebagai media tanam memiliki kendala karena memiliki pori-pori makro dan suhu pasir pada siang hari yang sangat tinggi. Oleh karena itu, perlu adanya penambahan bahan organik berupa sekam bakar dan ampas tebu untuk dapat mengatasi pori-pori makro dan suhu tinggi pasir saat siang hari serta meningkatkan pH media.

Sekam bakar memiliki kandungan utama berupa silika (SiO_2) (Harsono, 2002). Silika pada sekam bakar akan menekan proses transpirasi sehingga tanaman akan menggunakan air dengan lebih efisien dan tahan terhadap kekeringan. Menurut (Irawan, 2015) sekam bakar mempunyai sifat yang lebih remah

jika dibandingkan dengan media tanam yang lain. Sifat inilah yang akan menyebabkan akar mudah untuk menembus media dan mempercepat pertumbuhan akar. Ampas tebu merupakan hasil samping dari proses ekstraksi tebu yang memiliki kandungan utama berupa selulosa 40%, hemiselulosa 33%, dan lignin 11% (Christiyanto, 2005). Ampas tebu memiliki kemampuan menyerap dan menahan air yang baik sehingga sangat baik untuk memperbaiki sifat media tanam.

Pori-pori makro dan sifat remah pada sekam bakar dapat membuat umbi pada bawang merah berkembang menjadi lebih besar dan bagus. Selain itu, kemampuan penyerapan air pada sekam bakar dan ampas tebu dapat mencegah bawang merah dari cekaman kekeringan (Yulina *et al.*, 2018). Oleh karena itu dilakukanlah penelitian pengaruh campuran sekam bakar, pasir, dan ampas tebu terhadap pertumbuhan dan produksi bawang merah.

Penggunaan variasi kombinasi pasir, sekam bakar dan ampas tebu sebagai media tanam bawang merah bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi media tanam sekam bakar, pasir dan ampas tebu terhadap pertumbuhan bawang merah dan kombinasi media tanam sekam bakar, pasir dan ampas tebu terhadap pertumbuhan bawang merah yang paling optimal.

Bahan dan Metode

Perlakuan media dilakukan dengan cara mencampurkan sekam bakar, pasir dan ampas tebu diawal penanaman ke dalam polybag ukuran 30×30cm dengan berat total 1 kg masing-masing polybag dengan perbandingan menurut Bachtiar (2017):

P1 = 100g ampas tebu; 100g sekam bakar; 800g pasir (1:1:8)

P2 = 100g ampas tebu; 200g sekam bakar; 700g pasir (1:2:7)

P3 = 100g ampas tebu; 300g sekam bakar; 600g pasir (1:3:6)

P4 = 100g ampas tebu; 400g sekam bakar; 500g pasir (1:4:5)

Pupuk kandang ditambahkan sebanyak 40g setiap polybag sebagai sumber unsur hara. Perlakuan dilakukan pengulangan



sebanyak 6 kali. Media semai berupa campuran pupuk kandang dan tanah (1:1) yang telah digemburkan kemudian dibuat bedengan. Umbi disebar secara merata dan disiram secukupnya. Bibit bawang merah dapat dipindahkan bila sudah berumur 1 minggu. Bibit bawang merah dipilih, diaklimatisasi selama 1 minggu. Kemudian, bibit ditanam pada polybag. Penanaman bibit dilakukan dengan posisi batang tegak lurus dan masing-masing polybag satu bibit.

Perawatan tanaman berupa penyiangan dan penggemburan serta penyiraman air setiap pagi dan sore hari sebanyak 150 mL. Pengendalian hama dan penyakit secara mekanis dan pemupukan pupuk kotoran kambing yang dilakukan seminggu sekali sebanyak 40 g.

Parameter pertumbuhan vegetatif bawang merah diamati setiap minggu dimulai pada hari ke-0 HST hingga 56 HST, kandungan klorofil, berat basah, berat kering yang diamati pada 56 HST. Tinggi total bawang merah diukur dari pangkal batang (batang yang berada di permukaan tanah) hingga bagian tanaman tertinggi, jumlah daun dihitung dari jumlah daun yang terbuka sempurna dan daun yang jatuh. Panjang daun diukur dari mulai perbatasan pangkal daun hingga ujung daun. Jumlah anakan dihitung dari jumlah tunas yang keluar dari umbi bawang merah. Berat basah ditimbang dari berat total tanaman setelah dibersihkan. Berat kering ditimbang dari tanaman yang sudah dibersihkan dan dioven dengan suhu 60°C selama 3 hari atau hingga didapatkan berat konstan.

Pengukuran kadar klorofil menurut (Setiari, 2009) dilakukan dengan menimbang daun ke 2,3 atau 4 sebanyak 0.1 mg, setelah itu digerus dan diekstrak dengan larutan aseton PA sebanyak 10 mL. Kemudian ekstrak disaring dengan kertas saring, dimasukkan kedalam tabung reaksi dan dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer UV Vis pada panjang gelombang 644 nm dan 663 nm. Perhitungan kadar klorofil ditentukan dengan menggunakan rumus:

Klorofil a: 1.07 (OD 663) - 0.094 (OD 644)

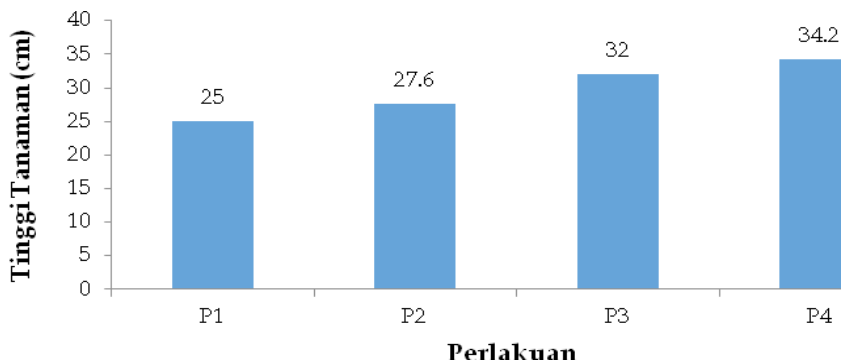
Klorofil b: 1.77 (OD 644) - 0.28 (OD 663)

Klorofil total : 0.79 (OD 663) + 1.076 (OD 644)

Pengukuran faktor lingkungan berupa suhu dan kelembapan udara dilakukan setiap minggu yaitu bersamaan dengan pemupukan dan pengamatan vegetatif tanaman. Analisis data dengan menggunakan uji Analysis of Variance (ANOVA) dengan satu faktorial menggunakan aplikasi software SPSS22 dan dilanjutkan uji Duncan dengan taraf 5% apabila terdapat beda nyata.

Hasil dan Pembahasan

Parameter yang dilakukan pada penelitian yaitu tinggi total tanaman, panjang daun, jumlah anakan, jumlah daun, berat basah, berat kering, dan kadar klorofil. Tinggi total tanaman pada bawang merah merupakan hasil perkembangan dari sel-sel yang membelah secara mitosis dan menghasilkan sel yang sama persis pada suatu jaringan yang berada diujung batang yaitu jaringan meristem apikal (Iskandar *et al.*, 2015). Sel sel pada jaringan muda ini akan bertambah dan menyebabkan adanya penambahan tinggi pada suatu tanaman. Hasil data tinggi tanaman perlakuan tersaji pada Gambar 1.



Gambar 1. Diagram rata-rata tinggi total tanaman bawang merah (*A. cepa* L.) Umur 56 HST



Keterangan

P1 = 100g ampas tebu; 100g sekam bakar; 800g pasir (1:1:8)

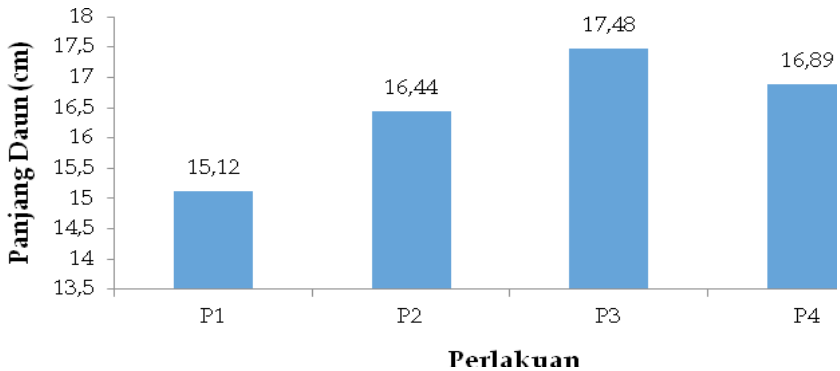
P2 = 100g ampas tebu; 200g sekam bakar; 700g pasir (1:2:7)

P3 = 100g ampas tebu; 300g sekam bakar; 600g pasir (1:3:6)

P4 = 100g ampas tebu; 400g sekam bakar; 500g pasir (1:4:5)

Diagram rata-rata tinggi total tanaman bawang merah (Gambar 1.) menunjukkan rata-rata tertinggi di perlakuan P4 (100g ampas tebu; 400g sekam bakar; 500g pasir) yaitu sebesar 34.2 cm sedangkan terendahnya pada perlakuan P1 (100g ampas tebu; 100g sekam bakar; 800g pasir) sebesar 25 cm. Tinggi tanaman total semakin meningkat sesuai dengan banyaknya kandungan sekam bakar pada media. Hal ini dikarenakan kandungan unsur hara P pada sekam bakar, ampas tebu, dan pupuk kotoran kambing yang berperan dalam sintesis protein (Juliana, 2015). Enzim yang tersusun atas protein tersebut akan berperan sebagai katalis dan mempercepat reaksi biokimia pada sel, sehingga metabolisme sel juga akan berjalan cepat. Sel akan mengalami pembelahan dan pemanjangan yang akan membentuk organ pada tanaman. Unsur K pada sekam bakar, ampas tebu dan pupuk kotoran kambing dapat merangsang titik tumbuh pada tanaman yang akan mempengaruhi tinggi tanaman (Iskandar, 2015). Unsur hara N akan mengatur produksi protein yang dapat mengaktifkan sel yang terdapat di meristem untuk melakukan pembelahan serta meningkatkan proses fotosintesis karena merupakan salah satu unsur penyusun klorofil (Iskandar *et al.*, 2015).

Panjang daun pada tanaman bawang merah menunjukkan adanya perkembangan pada meristem apikal dan interkalar. Hasil perhitungan data panjang daun tersaji dalam Gambar 2.



Gambar 2. Diagram rata-rata panjang daun bawang merah (*A. cepa* L.) Umur 0 HST

Keterangan

P1 = 100g ampas tebu; 100g sekam bakar; 800g pasir (1:1:8)

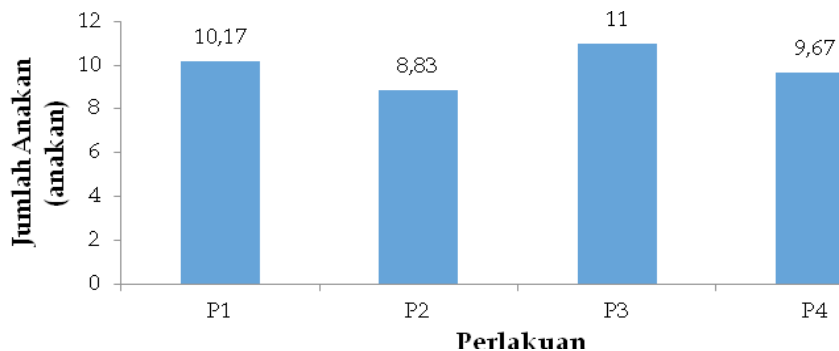
P2 = 100g ampas tebu; 200g sekam bakar; 700g pasir (1:2:7)

P3 = 100g ampas tebu; 300g sekam bakar; 600g pasir (1:3:6)

P4 = 100g ampas tebu; 400g sekam bakar; 500g pasir (1:4:5)

Diagram rata-rata panjang daun bawang merah (Gambar 2.) menunjukkan rata-rata tertinggi di perlakuan P3 (100g ampas tebu; 300g sekam bakar; 600g pasir) yaitu sebesar 17.48 cm sedangkan terendah pada perlakuan P1 (100g ampas tebu; 100g sekam bakar; 800g pasir) sebesar 15.12 cm. Panjang daun hanya diamati hingga minggu ke-0 karena pada minggu selanjutnya daun sudah mulai gugur dan terurai sehingga data daun tidak bisa ditentukan. Hal ini kemungkinan dikarenakan kandungan unsur P dan N pada pupuk kotoran kambing yang ditambahkan pada media dan didukung oleh kandungan unsur P dan N dari media sekam bakar dan ampas tebu. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Nasution (2016), dimana pemberian pupuk kandang sapi memberi pengaruh pada pertumbuhan dan produksi bawang merah. Unsur N merupakan unsur yang menyusun klorofil pada daun, sehingga jika unsur N tercukupi maka kadar klorofil tinggi, fotosintesis berjalan optimal, asimilatnya tersedia dalam jumlah yang cukup untuk pertumbuhan vegetatif.

Jumlah anakan pada bawang merah berasal dari kuncup yang menghasilkan titik tumbuh pada diskus umbi bawang merah yang berada didalam tanah. Data jumlah anakan tersedia didalam Gambar 3.



Gambar 3. Diagram rata-rata jumlah anakan bawang merah (*A. cepa* L.) Umur 8 HST

Keterangan

P1 = 100g ampas tebu; 100g sekam bakar; 800g pasir (1:1:8)

P2 = 100g ampas tebu; 200g sekam bakar; 700g pasir (1:2:7)

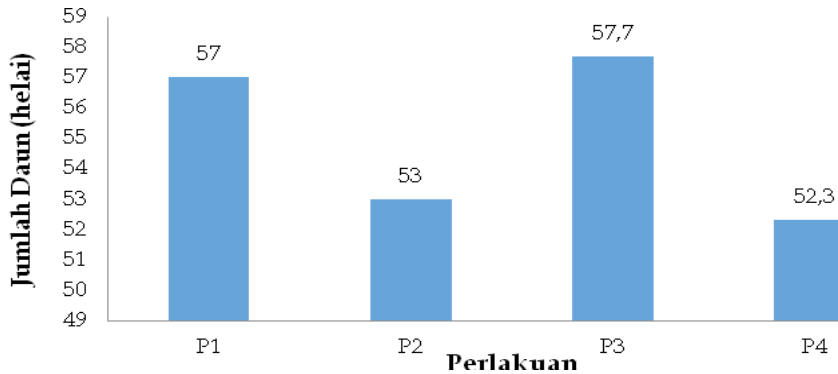
P3 = 100g ampas tebu; 300g sekam bakar; 600g pasir (1:3:6)

P4 = 100g ampas tebu; 400g sekam bakar; 500g pasir (1:4:5)

Diagram rata-rata jumlah anakan bawang merah (Gambar 3.) menunjukkan rata-rata tertinggi di perlakuan P3 (100g ampas tebu; 300g sekam bakar; 600g pasir), sedangkan terendahnya pada perlakuan P2 (100g ampas tebu; 200g sekam bakar; 700g pasir). Hal ini dikarenakan kandungan unsur N pada pupuk kotoran kambing, sekam bakar, dan ampas tebu yang menyusun asam nukleat (Rahman, 2016). Asam nukleat menyimpan informasi genetik dalam sel semua makhluk hidup yang akan mengintruksikan bagaimana sel harus membuat protein dan menyebabkan aktifnya sel pada jaringan meristem apikal dan melakukan pembelahan (Iskandar *et al.*, 2015). Penjabaran tersebut sesuai dengan pernyataan Nasution (2016), yang menyebutkan bahwa kandungan unsur N akan merangsang tumbuhnya anakan

dan akan menyebabkan diperolehnya hasil panen dengan jumlah umbi yang lebih banyak.

Pertambahan jumlah daun beriringan dengan pertambahan tinggi tanaman. Semakin tinggi tanaman, maka ruas - ruas pada tanaman semakin bertambah dan menyebabkan pertambahan jumlah daunnya. Hasil perhitungan jumlah daun disajikan didalam Gambar 4.



Gambar 4. Diagram rata-rata jumlah daun bawang merah (*A. cepa* L.) Umur 8 HST

Keterangan

P1 = 100g ampas tebu; 100g sekam bakar; 800g pasir (1:1:8)

P2 = 100g ampas tebu; 200g sekam bakar; 700g pasir (1:2:7)

P3 = 100g ampas tebu; 300g sekam bakar; 600g pasir (1:3:6)

P4 = 100g ampas tebu; 400g sekam bakar; 500g pasir (1:4:5)

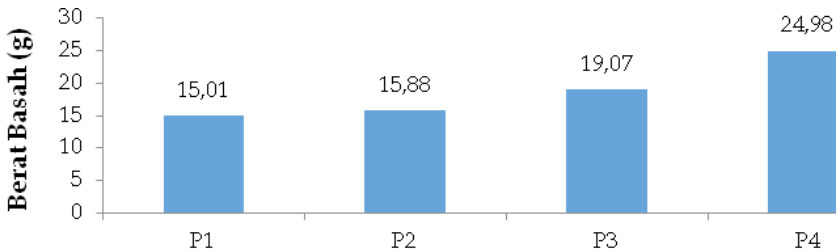
Diagram rata-rata jumlah daun bawang merah (Gambar 4.) menunjukkan rata-rata tertinggi di perlakuan P3 (100g ampas tebu; 300g sekam bakar; 600g pasir), sedangkan terendahnya pada perlakuan P4 (100g ampas tebu; 400g sekam bakar; 500g pasir). Perlakuan P1 (100g ampas tebu; 100g sekam bakar; 800g pasir) memiliki jumlah daun yang banyak namun memiliki tinggi total tanaman yang paling rendah. Hal ini menunjukkan bahwa unsur hara yang diserap dan hasil fotosintat yang dihasilkan dari proses fotosintesis lebih digunakan untuk pertambahan jumlah daun ketimbang tinggi tanaman. Namun sebaliknya, unsur hara dan



hasil fotosintat pada 100g ampas tebu; 400g sekam bakar; 500g pasir lebih dialokasikan untuk tinggi tanaman.

Pada 100g ampas tebu; 400g sekam bakar; 500g pasir kandungan sekamnya paling banyak sehingga dapat menahan air yang masuk agar tidak langsung lolos ke bawah dan digunakan sebagai komponen utama penyusun sitoplasma dalam sel sehingga tanamannya lebih tinggi namun jumlah daun lebih sedikit, begitu juga sebaliknya dengan 100g ampas tebu; 100g sekam bakar; 800g pasir daunnya lebih banyak namun tingginya lebih rendah karena kandungan pasirnya lebih banyak sehingga air lebih cepat turun. Menurut Adelia (2013), Fe pada pasir merupakan bagian dari enzim yang membawa elektron dalam proses fotosintesis dan respirasi. Apabila unsur Fe tidak tercukupi, klorofil tidak terbentuk sempurna sehingga proses fotosintesis dan respirasi yang terjadi tidak berjalan secara optimal. Akibatnya, energi yang dihasilkan sedikit penyerapan unsur hara berjalan lambat. Hal ini akan menyebabkan pertumbuhan tanaman stagnan.

Berat basah tanaman menunjukkan aktivitas metabolisme pada sel tanaman. Berat basah ini dipengaruhi oleh kandungan air, unsur hara, dan hasil metabolisme. Data perhitungan berat basah disajikan pada Gambar 5.



Perlakuan

Gambar 5. Diagram rata-rata berat basah bawang merah (*A. cepa L.*) Umur 8 HST

Keterangan

P1 = 100g ampas tebu; 100g sekam bakar; 800g pasir (1:1:8)

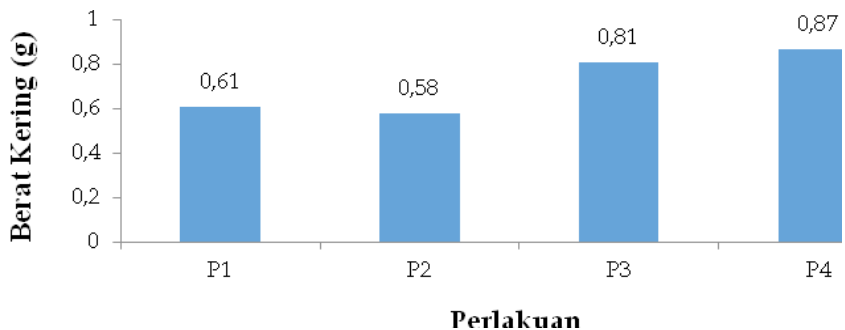
P2 = 100g ampas tebu; 200g sekam bakar; 700g pasir (1:2:7)

P3 = 100g ampas tebu; 300g sekam bakar; 600g pasir (1:3:6)

P4 = 100g ampas tebu; 400g sekam bakar; 500g pasir (1:4:5)

Diagram rata-rata berat basah bawang merah (Gambar 5.) menunjukkan rata-rata tertinggi di perlakuan P4 (100g ampas tebu; 400g sekam bakar; 500g pasir), sedangkan terendahnya pada perlakuan P1 (100g ampas tebu; 100g sekam bakar; 800g pasir). Hal ini dikarenakan kandungan sekam bakar pada media tanam yang lebih tinggi sehingga media akan lebih banyak menahan air dan tanaman dapat menggunakan air dengan lebih efisien. Air pada tanaman akan digunakan untuk menyusun sitoplasma pada sel sehingga berat basah tanaman juga akan menjadi lebih berat. Kadar silika pada sekam bakar yang tinggi akan membantu penyerapan nutrisi berjalan dengan lebih optimal sehingga pertumbuhan tanamannya juga menjadi lebih bagus.

Berat kering tanaman menunjukkan hasil bersih penimbunan asimilasi CO₂ yang didapatkan setelah tanaman melalui proses pengovenan dan didapatkan berat konstan. Data perhitungan berat kering disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Diagram rata-rata berat basah bawang merah (*A. cepa* L.) Umur 8 HST

Keterangan

P1 = 100g ampas tebu; 100g sekam bakar; 800g pasir (1:1:8)

P2 = 100g ampas tebu; 200g sekam bakar; 700g pasir (1:2:7)

P3 = 100g ampas tebu; 300g sekam bakar; 600g pasir (1:3:6)

P4 = 100g ampas tebu; 400g sekam bakar; 500g pasir (1:4:5)

Diagram rata-rata berat kering bawang merah (Gambar 6.) menunjukkan rata-rata tertinggi di perlakuan P4 (100g ampas tebu; 400g sekam bakar; 500g pasir), sedangkan terendahnya



pada perlakuan P2 (100g ampas tebu; 200g sekam bakar; 700g pasir). Hal ini dikarenakan kadar N dan P pada pupuk kotoran kambing, sekam bakar dan ampas tebu akan menyusun klorofil dan menyebabkan tingginya kandungan klorofil. Selain itu, unsur K pada pupuk kotoran kambing, sekam dan ampas tebu akan mengatur pembukaan dan penutupan stomata. Dengan adanya ketiga unsur tersebut fotosintesis akan berjalan optimal. Fotosintesis merupakan salah satu cara asimilasi karbon karena dalam fotosintesis karbon bebas dari CO_2 diikat (difiksasi) menjadi gula (Iskandar *et al.*, 2015). Hal ini sesuai dengan teori Suryaningrum (2016), yang menyebutkan bahwa berat kering pada tanaman mencerminkan akumulasi senyawa organik yang merupakan hasil dari sintesis senyawa anorganik oleh tanaman terutama CO_2 dan air. Selain itu, kadar silika yang tinggi pada sekam bakar akan membantu dalam penyerapan nutrisi (Putri, 2016). Semakin banyak nutrisi yang diserap semakin optimal proses metabolisme sel, pembelahan sel akan lebih cepat sehingga berat kering juga akan semakin tinggi.

Selain itu, penyerapan kandungan nutrisi yang berbeda pada tanaman juga dapat menjadi salah satu faktor tinggi rendahnya berat kering tanaman. Hal ini sesuai dengan teori yang dinyatakan oleh Tambunan (2014) bahwa kemampuan tanaman untuk menyerap unsur hara selama pertumbuhan dan perkembangannya itu tidak sama. Waktu dan jumlah unsur yang dibutuhkan intensitasnya berbeda pada setiap tanaman meskipun ditanam pada waktu yang sama.

Kadar klorofil pada suatu tanaman menentukan kemampuan tanaman dalam menangkap cahaya yang akan digunakan dalam proses fotosintesis. Semakin tinggi kadar klorofil dalam daun, maka semakin tinggi juga kemampuan daun tersebut dalam menangkap cahaya. Hasil perhitungan kadar klorofil tersedia dalam Tabel 1.

Tabel 1. Data Klorofil Bawang Merah Minggu ke-8

Perlakuan	Klorofil a (mg/g)	Klorofil b (mg/g)	Klorofil total (mg/g)
P1	0.011	0.022	0.024
P2	0.008	0.011	0.014
P3	0.007	0.008	0.011
P4	0.012	0.016	0.022

Keterangan

P1 = 100g ampas tebu; 100g sekam bakar; 800g pasir (1:1:8)

P2 = 100g ampas tebu; 200g sekam bakar; 700g pasir (1:2:7)

P3 = 100g ampas tebu; 300g sekam bakar; 600g pasir (1:3:6)

P4 = 100g ampas tebu; 400g sekam bakar; 500g pasir (1:4:5)

Tabel rata-rata kadar klorofil bawang merah (Tabel 1.) menunjukkan rata-rata tertinggi di perlakuan P1 (100g ampas tebu; 100g sekam bakar; 800g pasir), sedangkan terendahnya pada perlakuan P3 (100g ampas tebu; 300g sekam bakar; 600g pasir). Menurut Mashud (2007), klorofil total berkaitan erat dengan kecepatan fotosintesis. Klorofil a lebih berperan dalam proses fotosintesis. Hal ini dikarenakan klorofil a merupakan pigmen utama yang menangkap sinar matahari untuk fotosintesis, sedangkan klorofil b adalah pigmen aksesori yang mengumpulkan sinar matahari dan kemudian dihantarkan ke klorofil a.

Tinggi rendahnya kadar klorofil dapat dipengaruhi oleh kandungan media yang digunakan. Pada perlakuan 100g ampas tebu; 100g sekam bakar; 800g pasir, pasir yang terdapat pada media lebih banyak yaitu sebesar 800g. Unsur Fe pada pasir akan membantu dalam proses pembentukan klorofil (Adelia, 2013). Pada perlakuan 100g ampas tebu; 400g sekam bakar; 500g pasir, kadar klorofilnya tinggi karena kandungan sekam bakar yang lebih banyak. Sekam bakar mengandung unsur N yang membantu dalam pembentukan klorofil, selain itu sekam bakar akan menahan unsur N yang terdapat pada pupuk kotoran kambing dan ampas tebu agar tidak hilang bersama air. Selain itu, kadar klorofil pada tanaman juga dipengaruhi oleh umur daun dan tahapan fisiologis tanaman (Hendriyani, 2009).



Faktor lingkungan merupakan salah satu faktor yang berasal dari luar tubuh tanaman dan dapat mempengaruhi pertumbuhan. Berdasarkan hasil pengukuran, diketahui rata-rata suhu dan kelembapan udara yaitu 29°C dan 73%. Suhu yang dibutuhkan bawang merah untuk melakukan pertumbuhan yaitu antara 25-32°C, sedangkan kelembapan udara yang dibutuhkan dalam perkembangan tanaman bawang merah yaitu sekitar 50%-70% (Dinas Pertanian, 2016).

Suhu dan kelembapan udara rata-rata hasil pengukuran sudah sesuai dengan yang dibutuhkan oleh bawang merah. Namun sebenarnya terdapat perbedaan yang signifikan pada pengukuran pagi dan siang hari. Pada pagi hari suhu di Cangkringan 25°C sedangkan siang hari suhu mencapai 36°C. Pada siang hari kelembapan udara sekitar 42% sedangkan pada pagi hari kelembapan 94%. Suhu yang tinggi dan kelembapan udara rendah dapat memacu penguapan yang berlebihan pada media tanam, dan mengakibatkan tanaman menjadi layu, sedangkan suhu rendah dan kelembapan udara yang tinggi akan membuat tanaman bawang merah akan sulit menghasilkan umbi (Rahman, 2016). Berbagai upaya dilakukan, namun belum dapat mengatasi perubahan suhu dan kelembapan udara sesuai dengan yang dibutuhkan oleh bawang merah. Pada suhu tinggi tanaman akan layu.

Hasil ANOVA menunjukkan bahwa perlakuan 100g ampas tebu; 400g sekam bakar; 500g pasir berpengaruh terhadap pertumbuhan vegetatif bawang merah dan dilanjutkan dengan uji Duncan taraf 5% yang menunjukkan bahwa perlakuan 100g ampas tebu; 400g sekam bakar; 500g pasir berpengaruh signifikan terhadap tinggi total tanaman, berat basah dan berat kering namun tidak berpengaruh pada panjang daun, jumlah anakan dan jumlah daun. Hal ini dipengaruhi oleh kandungan air pada media, dan kemampuan tanaman dalam menyerap nutrisi yang berbeda-beda. Penentuan dosis terbaik dilakukan dengan melihat hasil analisis pada masing-masing perlakuan.

Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah kombinasi media tanam sekam bakar, pasir dan ampas tebu memiliki pengaruh terhadap pertumbuhan bawang merah, terutama pada parameter tinggi total tanaman, berat basah, dan berat kering. Kombinasi media tanam sekam bakar, pasir dan ampas tebu yang memiliki pengaruh terhadap pertumbuhan bawang merah yang paling bagus adalah pada perlakuan 100g ampas tebu; 400g sekam; 500g pasir.

Kontribusi Penulis

AP mngkaji desain penelitian serta menyiapkan naskah publikasi, IAYR melakukan pekerjaan laboratorium dan analisis data.

Daftar Pustaka

- Adelia, P. F., Koesriharti, dan Sunaryo. 2013. Pengaruh Penambahan Unsur Hara Mikro (Fe dan Cu) Dalam Media Paitan Cair dan Kotoran Sapi Cair Terhadap Pertumbuhan dan Hasil Bayam Merah (*Amaranthus tricolor* L.) Dengan Sistem Hidroponik Rakit Apung. *Jurnal Produksi Tanaman*, 1 (3): 48-58.
- Bachtiar, S., M. Rijal, D. Safitri. 2017. Pengaruh Komposisi Media Hidroponik Terhadap Pertumbuhan Tanaman Tomat. *Jurnal Biologi Sel*, 6(1): 52-60.
- Christiyanto, M. A. S. 2005. Perlakuan Fisik dan Biologis pada Limbah Industri Pertanian Terhadap Serat Kasar. *Laporan Kegiatan*. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Dinas Pertanian. 2016. *Teknologi Budidaya Komoditas Sayuran Spesifik Bawang Merah*. Jombang: Kelompok Jabatan Fungsional Penyuluhan Pertanian Lapangan.
- Harsono, H. 2002. Pembuatan Silika Amorf Dari Limbah Sekam Padi. *Jurnal Ilmu Dasar*, 3 (2): 98-103.
- Hendriyani, I. S., dan N. Setiari. 2009. Kandungan Klorofil dan Pertumbuhan Kacang Panjang (*Vigna sinensis*) Pada Tingkat



Penyediaan Air Yang Berbeda. *Jurnal Sains & Mat*, 17 (3): 145-150.

- Irawan, Arif dan Yeremias Kafiari. 2015. Pemanfaatan Cocopeat dan Arang Sekam Padi Bagi Media Tanam Bibit Cempaka Wasian (*Elmerrilia Ovalis*). *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*. 1 (4): 805-808.
- Iskandar, E. P., Sampoerno, dan S. I. Saputra. 2015. Pertumbuhan Beberapa Klon Bibit Kakao (*Theobroma cacao* L.) Pada Tanah Gambut dan Podsolik Merah Kuning. *JOM Faperta*, 2(1): 1-10.
- Juliana, E., Sarifuddin, dan Jamilah. 2015. Pemberian Zeolit dan Arang Sekam Pada Lahan Sawah Tercemar Limbah Pabrik Terhadap Pb Tanah dan Tanaman Padi. *Jurnal Online Agroekoteknologi*, 3 (2): 703-709.
- Kementrian Pertanian. 2017. *Laporan Kinerja*. Direktorat Jendral Hortikultura: Jakarta.
- Legono, D., Darmanto, J. Sujono, R. Jayadi, dan T. F. Fathani. 2011. Daya Dukung Lahan Kawasan Lereng Merapi Untuk Pertanian dan Peternakan Pasca Erupsi 2010. *Prosiding Simposium Gunung Merapi*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada. Hlm: 95-99.
- Mashud, N. 2007. Stomata dan Klorofil Dalam Hubungannya dengan Produksi Kelapa. *Buletin Palma*, No. 32: 52-59.
- Nasution, R., E. Pane, dan Gusmeizal. 2016. Respon Pemberian Pupuk Kandang Sapi dan Super Bokasi AOs Amino Terhadap Pertumbuhan dan Produksi Bawang Merah (*Allium ascanicum* L.). *Jurnal Agrotekma*, 1 (1): 12-23.
- Putri, H. F., dan S. Haryanti. 2016. Pengaruh Penggunaan Pupuk Nanosilika Terhadap Pertumbuhan Tanaman Tomat (*Solanum lycopersicum*) Var. Bulat. *Buletin Anatomi dan Fisiologi*, 24 (1): 34-41.
- Rahman, A. S., A. Nugroho, dan R. Soeslistyono. 2016. Kajian Hasil Bawang Merah (*Allium ascalonicum* L.) Di Lahan dan Polybag Dengan Pemberian Berbagai Macam dan Dosis Pupuk Organik. *Jurnal Produksi Tanaman*, 4 (7): 538-546.

- Setiari, N., dan Y. Nurchayati. Eksplorasi Kandungan Klorofil pada Beberapa Sayuran Hijau Sebagai Alternatif Bahan Dasar Food Supplement. *Jurnal BIOMA*, 11 (1): 6-10.
- Suryaningrum, R., E. Purwanto, dan Sumiyati. 2016. Analisis Pertumbuhan Beberapa Varietas Kedelai pada Perbedaan Intensitas Cekaman Kekeringan. *Jurnal Agrosains*, 18 (2): 33-37.
- Tambunan, W. A., R. Sipayung., dan F. E. Sitepu. 2014. Pertumbuhan dan Produksi Bawang Merah (*Allium ascalonicum* L.) Dengan Pemberian Pupuk Hayati Pada Berbagai Media Tanam. *Jurnal Online Agroekoteknologi*, 2 (2): 825-836.
- Yulina, H., R. Devnita, dan R. Harryanto. 2018. Respon Air Tersedia dan Bobot Isi Tanah pada Tanaman Jagung Manis dan Brokoli terhadap Kombinasi Terak Baja dan Bokashi Sekam Padi pada Andisol, Lembang. *Jurnal Agrikultura*. 29(2): 66-72.



Production Process Optimization of Fermented Taro Paste (Poi) With A Variation of The Inoculum Ratio Between *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactococcus lactis*

Jayen Aris Kriswantoro¹, Ulya Alviredieta¹, Agatha Nabilla Lestari¹, Jihan Nisa Al Iffah¹, Chaerunisa¹, Dini Achnafani², Pingkan Aditiawati¹

¹School of Life Sciences and Technology, Bandung Institute of Technology, Ganesha 10, Bandung, 40132, Indonesia

²Indonesia Agency for the Assessment and Application of Technology, PUSPITEK Serpong, Tangerang, 15314, Indonesia

Abstract. Fermented food is one type of food which has a high potency to be developed as a source of high nutritional food. A foodstuff will have better nutritional content, taste, also longer shelf life-time after fermentation occurred. Indonesia's taro (*Colocasia esculenta*) commodity considered to be higher than other countries, but the utilization was still low. Poi is one of a kind of Hawaiian food that ferment taro using Lactic Acid Bacteria (LAB), *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactococcus lactis*. Unfortunately, this fermentation was still processed traditionally which cause difficulties to produce on a large scale and has inconsistent quality due to uncontrolled microbial activity. Methods of fermenting taro will be fixed and ratio of bacterial inoculum will be optimized in this research. Therefore, production can be done to reach industrial level to maximize the potential of local natural resources of Indonesia. After screening the pre-dominant bacteria that found in fermented poi, it was found that *L. mesenteroides* and *L. lactis* are bacterium pre-dominant in the fermentation process. Both bacterial growth curve was made by spectrophotometric method which shows that the optimum age of the inoculum added in the taro mash is 8 hours. Optimization process done by varying the amount of inoculum of *L. mesenteroides* and *L. lactis*, at 1:1, 1:2 and 2:1 (v/v). The parameters used to determine the best variety are the protein content, sugar content, total acidity, pH level, the presence of coliform bacteria, and the results physical characteristics assessment through organoleptic tests. Based on the results of a quantitative test (test of protein content, sugar content, pH and total acid content) and qualitative (coliform

and organoleptic test), the best Poi is obtained from the fermentation process by comparing the amount of inoculum 1:2 (*L. mesenteroides* and *L. lactis*).

Keywords: *Fermentation, inoculum, L. lactis, L. mesenteroides, optimization, poi*

Introduction

Bogor Taro (*Colocasia esculenta*) is a one kind of plant in family Araceae that comes from Indonesia and mainly can be found in Bogor, Cianjur, Kuningan, Cisarua, Pangalengan, Temanggung, and Malang. It has high productivity since all of the part from Bogor Taro can be used as food, feed, drugs and cosmetic compounds. As stated by BPKD West Java Province¹, the production of taro is reached 57,000 tons in 2008 and still growing. Weather independent makes it easier to plant taro in all condition.

The tuber of taro is widely used as food and traditionally processed by steaming or frying before it served as additional food and snack². Basically, taro tuber mainly contains 69.2 grams of water and 28.2 grams of carbohydrates out of 100 grams³. Processing taro tuber traditionally only make it softer but did not increase nutritional values as it contains low level of protein only at 1.5 grams out of 100 grams³.

There is such a taro paste named Poi which processed from fermented taro in Hawaii. It is widely used as a sauce or dessert in pudding, ice cream, and also for food⁴. Abang and Shittu⁵ found that it goes naturally by *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactococcus lactis* from the taro itself. It gave sour and unique flavor due to the microbial activity along their benefit for the health. Fermentation process would increase the nutritional values such as proteins, vitamins, minerals, and breaking complex sugar such as cellulose and starch into simple mono- or disaccharides so it can helps human body to digest easier as stated by FAO⁴. Fermented foods also contain probiotic bacteria that worthwhile in human digestive system.

Fermentation process performed with microbial activity that undergoes anaerobic catabolism (Stanbury *et al.*, 1984)⁷. It needs exact and defined microbial inoculum or starter in order to produce standardized and great quality of product. Metabolisms



activity of microorganisms also strongly depend on substrate and environmental condition where the microorganisms grow, so that naturally fermented food (not using inoculum starter) would give different product quality as the microorganisms growth uncontrolled. First thing to do is choosing the right microorganisms to perform the fermentation process. Next, inoculum optimization by varying the amount of microorganisms involved in fermentation is another step to standardize fermented product. Monitoring fermentation condition and several kind of parameters such as pH, sugar level, protein level, total acid level and organoleptic test should be performed in order to get acceptable product quality. Since Poi using *L. mesenteroides* and *L. lactis* for fermenting taro, varying the ratio between those microorganisms should make any differences in chemical, nutritional, and flavor of Poi. Taro would be sufficient as raw material as it is abundant and easy to find. Beside that, nutritional value of taro would increase due to metabolisms activity of those microorganisms. Later, fermenting taro is the new thing and it will contribute in diversification of Indonesia food product using bio-based technology in order to massive scale production that meet consumer needs and standards.

Materials and methods

This study was conducted in Fermentation Laboratory, Microbiology Department of ITB, for approximately 4 months. Taro samples were obtained from traditional markets in Bogor, West Java, Indonesia.

General Procedure

The first step of this research is isolation of the predominant bacteria involved in natural fermentation process in Poi production. 1 gram of Poi taken every 24 hours for 4 days from natural fermentation process and put in sterile water diluent (0.85% NaCl). The results of sample dilution inoculated into Pantothenat (PTT) Agar Medium and the Lactic Acid Bacteria (LAB) was isolated using spread methods. Bacterial isolation

which has obtained will be identified through observation of the bacterial cell morphology and enzymatic capabilities by biochemical tests. Identification results will be compared to the literature and isolates that have similar characteristics to *L. mesenteroides* and *L. lactis* will be taken as inoculum.

Growth curve of both isolates will be created in the PTT Broth Medium to observe the growth phase of bacteria and to determine the optimum age of inoculum that will be used in the fermentation process. Prior to making growth curve, standard curve is needed to ensure each absorbance or OD (Optical Density) that represents the number of bacterial cells contained in the sample. Bacterial culture that has been activated twice, will be measured its absorbance by using spectrophotometer. Then, dilute the bacterial culture to obtain some absorbance in the range of 0.1 to 0.9. Every bacterial culture in different absorbance is inoculated onto sterile PTT Agar Medium in petri dish and grown for 48 hours at the temperature of 37°C. The number of colonies was calculated and used to determine the number of bacterial cells. The standard curve was constructed by plotting the absorbance or OD in the x-axis, and the number of cells (Cell Forming Units per mL) on the y-axis. Based on these data, trend-line equation constructed and make sure that linearity (value of R^2) approaching 1 (at least 0.98).

The growth curve was constructed by plotting the age of inoculum (in hours) in the x-axis, and the log of the number of cells (log of Cell Forming Units per mL) on the y-axis. The number of cells in a liquid culture of bacteria obtained every 2 hours for 2 days with secondary data such as pH of the medium. The liquid culture sampled and measured the absorbance by using spectrophotometer at a wavelength of 600 nm (nanometre). The result is converted to the number of cells using the trend-line equation from standard curve.

Taro mash is made with mixing 1 kg of taro with 1L of water and steamed. Bacterial inoculum is mixed in steamed taro mash for about 10% v/v. Ratio of inoculum variations are 2:1, 1:2 and 1:1 (v/v) of those two isolates. The mash then stirred and incubated for 4 days at 37°C.



Every 12 hours during the fermentation process total acid content (titration method), sugar (phenol-sulfuric method), acidity (pH measurement), and protein content (Bradford's method) will be measured. After 4 days of fermentation, all variations of inoculum tested for the presence of fecal coliform bacteria using selective-differential medium (EMB or Eosin Methylen Blue Medium) to test the safety of the food which will be consumed.

The selection of the best ratio variation based on the amount of inoculum by using organoleptic test with 15 respondents by the observation of the physical characteristics of Poi which has been produced. Characteristics tested are color, aroma, and taste of the samples. Scoring will be given a value from 1 (most unfavorable) to 6 (most favorable). The general procedure of this research can be seen as figure 1.

Screening Bacterial Isolates

Gram Staining

Gram staining is a method used to differentiate bacteria into two types, Gram positive and Gram negative. Classification of both types are based on the structure of the bacterial cell wall. In general, the thickness of the peptidoglycan layer becomes the key differentiator of the two types of bacteria. In Gram-positive bacteria, peptidoglycan layer will be thicker than the Gram negative. Another difference is Gram-negative has lipopolysaccharide layer that can be dissolved in 96% of alcohol.

One loop of oose of bacterial cultures placed on an object glass which was being added by distilled water droplets. The object glass then heated using a bunsen burner until the water evaporated. Crystal violet added on the object glass and wat for 1 minute and rinsed with distilled water. Lugol added on the object glass and let it stand for 1 minute, then rinsed the excess lugol by distilled water. Alcohol 96% dropped for 30 seconds then add safranin for 20 seconds and rinsed the excess by distilled water.

Staining result was performed using a microscope. If the purple color observed in bacterial cells, the bacteria are classified as Gram positive. It can occur because of the strong bond between

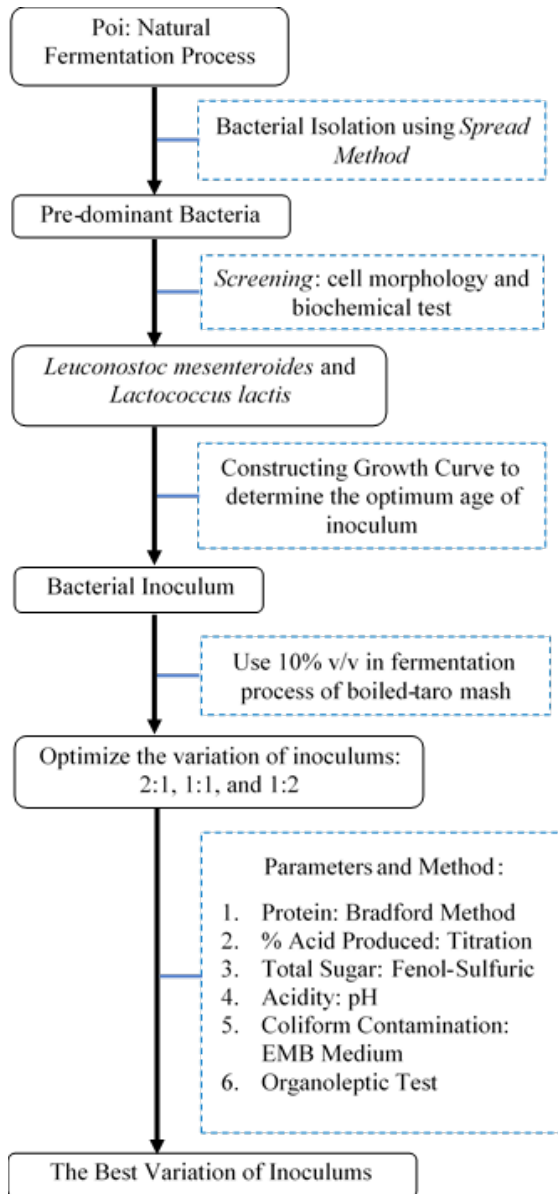


Figure 1. Scheme of Research Procedure



the reagent crystal violet with peptidoglycan in the cell wall that has been strengthened by Lugol, so the safranin reagent would not bind to the bacterial cell. If the red color is observed, so the bacteria are classified as Gram-negative bacteria. It happens because of the weak bonding between crystal violet reagent and thin peptidoglycan layer which make crystal violet would disappear by addition of alcohol 96%.

Biochemical Test: Sugar Fermentation and 6%-Salt Medium

Biochemical test used to see the ability of microorganisms to ferment sugar and to survive in a media condition containing 6% of salt. It would be relevant to its enzymatic activity on converting the substrate for producing energy in cellular respiration. The medium used is a broth media containing tryptone 10 g/L, NaCl 5 g/L, Bromocresol Purple (BCP) of 0.018 g/L, and sugar 5 g/L. There are 12 different types of sugars tested: glucose, galactose, raffinose, inositol, sorbitol, lactose, maltose, mannose, sucrose, fructose, xylose and arabinose. Sugar fermentation process will produce acid compounds that can be detected by BCP color changing to yellow due to the acidic pH after incubation for 24 hours. For the production of carbon dioxide (CO₂), gas as air bubbles would be seen in the Durham tube in the test tube. The second test is to see the ability of microorganisms to survive in conditions of medium containing 6% of salt. PTT Agar Medium made with 6% (w/v) NaCl and inoculated with bacterial culture using streak method and incubated for 48 hours at 37°C. *L. mesenteroides* survive on this media rather than *L. lactis*

Parameters and Method

Protein Contents: Bradford Test

Bradford test method used to determine the levels of total protein in a sample by using Bradford reagent. The 5X concentration reagent was prepared by mixing 100 mg of Coomassie Brilliant Blue G-250, 47 ml of Methanol 100%, 100 ml of phosphoric acid (85%) and water until its volume reached 200 ml. Before testing the sample, standard curve was made using a

standard solution of BSA (Bovine Serum Albumin). BSA standard concentrations used for protein standard curve are 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, and 1 mg/ml. For the analysis of protein content of the sample, 1 gram sample of taro paste is diluted in 9 ml of distilled water. 100 μ L of the sample mixed with 5 ml of Bradford reagent and protein concentration of the sample determined by measuring the absorbance at a wavelength of 595 nm with a spectrophotometer.

Production of acid(%) and Acidity: Titration and pH

Total 10 grams of samples diluted with distilled water to 100 ml. 5 drops of phenolphthalein added into the diluted sample then titrated with 0.1 N of NaOH solution. Total acid content is calculated by the equation shown in Figure 2.

$$\text{Acid Content (\%)} = \frac{\text{Volume of Titrant (mL)}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{\text{Normality of NaOH}}{\text{eq}} \times 0.9 \times 100\%$$

Figure 2. Equation for Calculating Acid Content (%)

The pH measured using a pH-meter every 12 hours of taro fermentation paste within 4 days. Poi partially sampled and stored in a separate container then measured with pH-metre.

Sugar Content: Fenol-Sulphuric Method

This method is used to determine glucose levels in a sample using a standard solution of glucose with phenol reagent and concentrated sulfuric acid. Prepared 5% w/v of phenol by dissolving 5 grams of crystalline phenol with 100 mL of distilled water in a dark glass bottle. Prepared concentrated sulfuric acid (H₂SO₄ 95%) in dark glass bottles. Diluted samples of cell-free medium (by centrifugation or filtration) for about 10x. Put up 0.5 mL of the diluted sample in a test tube. Add 0.5 mL of 5% phenol and 2.5 mL of 95% sulfuric acid quickly with a glass pipette. Homogenized reaction with using vortex for 30 seconds per sample. The reaction was incubated at 30° C water bath for 10 minutes. Measured sample absorbance at wavelength (λ) 490



nm. Use blank in the form of distilled water mixed reagents mentioned above.

Construct a standard curve of phenol-sulfuric by making a series of glucose solution with varying concentrations of glucose, then do the phenol-sulfuric test and measure its absorbance. The concentration of glucose used are 0, 100, 300, 500, 700, 900, and 1000 mg/L (ppm). Then, from the results of these measurements are made linear regression, up to linearity (R^2 -value) approaching at least 0.95. Standard curve was used for the calculation of the quantity of sugar in the sample. Samples must be diluted so that the sample solution can get into the range of the concentration of glucose in the standard curve that has been made.

Coliform Contamination: EMB Medium

Contamination Coliform Test is used to detect the presence of fecal coliform bacteria contamination in taro paste processed products. Taro paste samples were fermented for 4 days, sampled and diluted up to 100 times. One loop of oose was taken at each dilution and inoculated on EMB sterile medium in a petri dish. Incubate at 37°C for 24 hours. If the emergence of colonies observed EMB Medium is metallic green, then the sample has been contaminated by fecal bacteria contaminants. EMB Medium is a type of selective-differential medium, so that only fecal bacteria that will grow with the appearance of a typical colony color.

Organoleptic Test

Organoleptic test used to determine the acceptability of a product by giving a stimulus to the organ. Organoleptic testing using hedonic quality test that has aim to identify panelist responses to common properties, such as texture, smell/taste and color. While testing the level of preference is one kind of acceptance testing. A level of preference is a test of a product by requesting responses from the panelists about the likes and dislikes. In addition to the requested feedback on like it or not, panelists were also asked to tell his favorite level. The favorite level of the product is affected to a smell, taste and mouth stimulation.

Results and Discussion

Poi is a Hawaiian traditional fermentation product from taro tuber that undergoes natural fermentation. It needs no inoculum starter to start the fermentation process to convert taro tuber become taro paste with a sour taste flavor. As stated by Stanbury *et al.*,⁶, fermentation is a generation of energy (catabolism) from organic compounds through anaerobic condition. The flavor of Poi mainly caused by several acid compounds produced from this anaerobic metabolism.

Indonesia has high productivity of taro plantation also, especially Bogor Taro. Since it only used traditionally for food which has no substantial differences in nutritional value between processed and unprocessed taro tuber, it has high potency to use taro as Poi raw material. In addition of increasing nutritional value, fermentation process also increasing the economic value of taro tuber itself.

Natural fermentation occur without inoculum starter to ferment the raw material. It would yield different quality of fermentation product as the microbial activity that uncontrolled within fermentation process. To standardize fermentation process, pre-optimization process of fermentation of Poi firstly done with optimization taro mash: water (w/v) ratio, incubation period, and amount of bacterial inoculum. Traditionally, first step to fermenting taro is wash the taro. After that, steam it until soft and peeled, then mix it with water and grind. In this research, optimum fermentation was performed with mixing 1 kg taro mash with 1 L of water. Fermentation processed within 4 days at temperature 37 °C in the closed container.

Bacterial Isolates

Isolation of microorganisms from traditionally fermentation of Poi yield 6 isolates that might contributes in Poi fermentation. By morphological identification, two of the isolates closely related to *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactococcus lactis* which have coccus shape, chain arrangement, and Gram positive. To differentiate these isolates, biochemical test were performed and the results as Table 1 follow:



Table 1. Sugar and Salt Test

	Isolate C	Isolate F	<i>Leuconostoc</i> (L)	<i>Lactococcus</i> (L)
Glucose	+	+	+	+
Galactose	+	-	+	+/-
Lactose	+	+	+	-
Maltose	+	+	+	+
Mannose	+	+	+/-	*
Sucrose	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+
Xylose	+	-	+	-
Raffinose	+	-	-	-
Arabinose	+	-	+/-	+/-
Sorbitol	-	-	*	*
Inositol	-	-	*	*
Salt 6%	+	-	+	-

Note: (+) microorganisms can ferment sugar, (-) microorganisms can't ferment sugar, (*) test did not perform in literature (L), (L) based on literature.

Comparing isolates with literature, it shows that isolate C can be grown at 6% of salt as *Leuconostoc* species, while isolate F shows no growth at 6% of salt as *Lactococcus* species. It conveniently shows that isolate C is closely related to *Leuconostoc mesenteroides* and isolate F is closely related to *Lactococcus lactis*.

Growth Curve

Age of inoculum is an important thing in inoculum starter preparation. It can be determined by growth curve of each isolates that will show when the microorganisms reach their maximum growth rate (μ_{max}). Usually it occurs at half of their logarithmic phase, where the nutrient of the media still available and their metabolism occur rapidly⁷. Each growth curve of the two isolates results as Figure 3 and 4.

From the growth curve of the isolates, we can see the brief lag phase of those two isolates. This can be caused by twice activation of isolates so that there is no need adaptation period

for the microorganisms to grow. Logarithmic phase occur at 2 to 16 hours as well as acidity level of media decrease significantly. Decreasing acidity level of the media due to acid compounds produced by microorganisms as metabolite product. At 16 hours and on, microorganisms get into stationary phase which showed by declining the number of cells as well as increasing of pH level resulted by cell death. It might to occur as they produced some basic compound such as ammonia that will increase the pH level of the media. From those growth curve, we can see the μ_{max} reached at 8 hours when growth rate at the highest point.

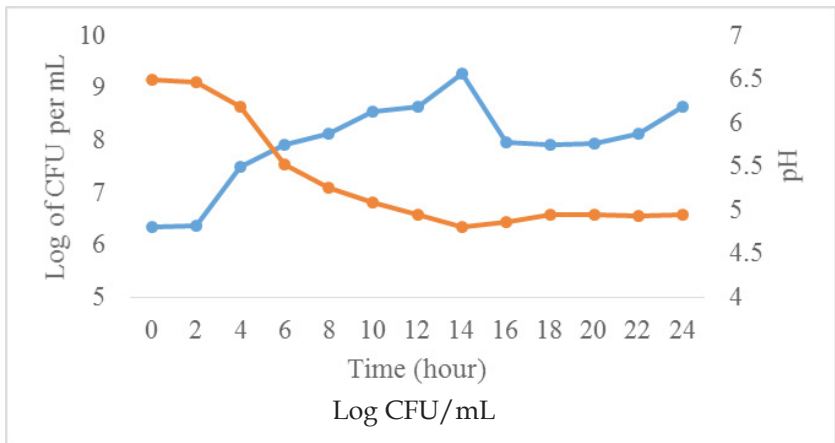


Figure 3. *Leuconostoc mesenteroides* growth curve

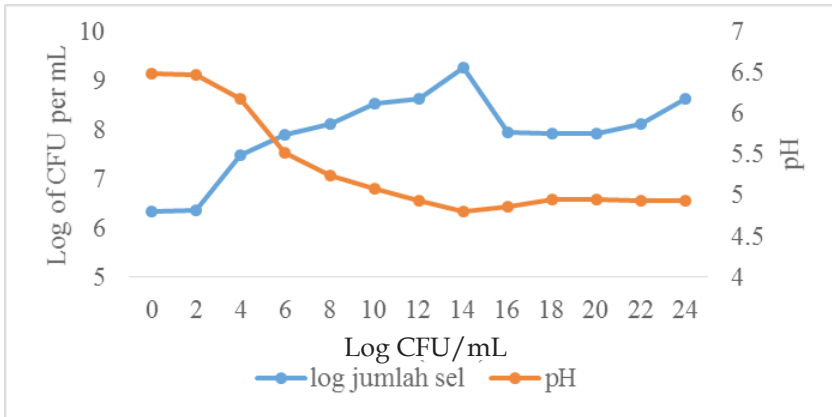


Figure 4. *Lactococcus lactis* growth curve

Total Acid Profile, Acidity Level, Total Protein Content, and Total Sugar Profile

Inoculum formulation is another important thing in inoculum consideration, as each of microorganisms perform different pathway of metabolism. This consideration can be determined by metabolite product and environmental condition which affect product quality. In this research, total acid profile, acidity level, total protein content, and total sugar profile are examined between 3 variations of inoculum, there are *L.mesenteroides*:*L.lactis* (v/v) 1:1, 1:2, and 2:1.

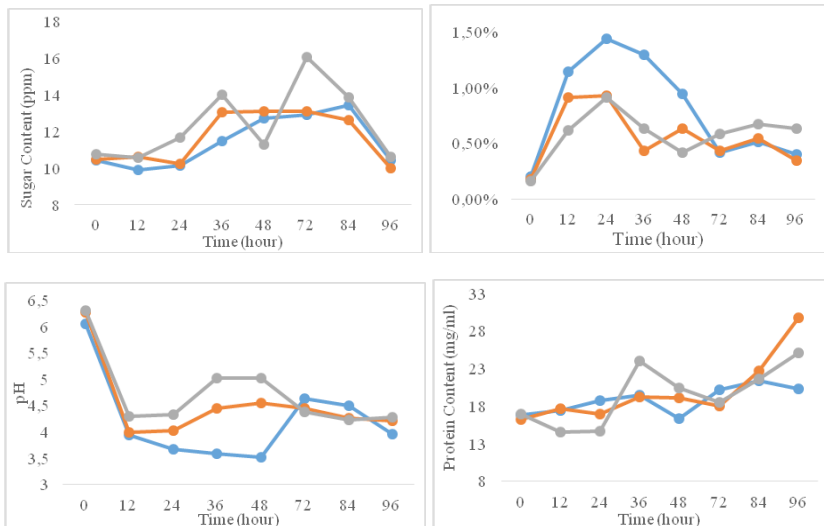


Figure 5. The profile of various Poi with different inoculum ratio.
 (A) Total acid profile; (B) Acidity level; (C) Total protein content; and (D)
 Sugar content

Total acid profile of Poi fermentation shows that on inoculum ratio of *L.mesenteroides*:*L.lactis* (v/v) 1:1 total acid increase significantly higher than other inoculum variations as shown in Figure 5A. It caused by both microorganisms perform synergistic acid production and both microorganisms are lactic acid bacteria⁸. But this inoculum did not perform stability level of total acid content because at 36 hours total acid content decrease significantly until 72 hours. Inoculum ratio of *L.mesenteroides*:*L.lactis* (v/v) 1:2 and 2:1 shows more stable total acid profile until 96 hours of fermentation at less than 1% and generally the maximum level of acid produced is at 24 hours of incubation period.

Total acid profile of Poi fermentation supported by the acidity level in the media while fermentation occur as shown in Figure 5B. It shows that inoculum ratio of *L.mesenteroides*:*L.lactis* (v/v) 1:1 has the lowest pH level among other inoculum until 48 hours. Inoculum ratio of *L.mesenteroides*:*L.lactis* (v/v) 1:2



shows pH level at 4 – 4.5 and more stable than other inoculum variations. This acidity level related to acid compound production of microorganisms as metabolite product of sugar catabolism.

Total protein content of Poi fermentation in Figure 5C shows that inoculum ratio of *L.mesenteroides*:*L.lactis* (v/v) 1:2 has the highest total protein content at 28 ppm at the end of fermentation process or 96 hours. While inoculum variation of *L.mesenteroides*:*L.lactis* (v/v) 1:1 has the least protein content at the end of fermentation process and sudden decrease protein content at 48 hours of incubation. Inoculum variation of 2:1 shows unstable protein content between 14 – 23 ppm and reach the highest point at about 23 ppm at 36 hours before it declines again.

Total sugar profile of Poi fermentation in Figure 5D shows that inoculum ratio of *L.mesenteroides*:*L.lactis* (v/v) 1:2 has the most stable total sugar content around 13 ppm at 36 – 48 hours and decrease to 10 ppm at the end of fermentation. Inoculum variation of 2:1 shows unstable sugar content at 36 – 84 hours between 11 – 16 ppm before it declines to around 10 ppm at the end of fermentation. While inoculum variation of 1:1 generally shows the least sugar content between those inoculum variations.

Physiologically, *L.mesenteroides* and *L.lactis* are lactic acid bacteria that can convert sugar into acid compound. *L.mesenteroides* is heterofermentative lactic acid bacteria that yield 1 mol of lactate, 1 mol of ethanol, and 1 mol of carbon dioxide from hexose catabolism⁹. While *L.lactis* is homofermentative lactic acid bacteria that yield lactate only from hexose catabolism¹⁰. It affect the environmental characteristic of Poi fermentation as shown above where inoculum ratio of *L.mesenteroides*:*L.lactis* (v/v) 1:1 and 2:1 produce unstable level of acid compound, protein content, and sugar content. Both microorganisms are lactic acid bacteria that synergistically produce lactic acid so that total acid content of inoculum ratio of *L.mesenteroides*:*L.lactis* of (v/v) 1:1 has the highest content of total acid compound as well as the pH level of this inoculum reach the lowest level. However, the unstable total acid content is due to the fast production rate of acid compound and microorganisms will reach their limiting external pH level

faster than usual. As studied by McDonald *et al.*,¹¹, *L.mesenteroides* will stop to grow when the external pH reach 3.5.

Total protein reach the highest point in inoculum ratio of *L.mesenteroides*:*L.lactis* (v/v) 1:2 due to protein production from *L.lactis* as cell protection in stationary phase when the nutrient become limited. This proteins forms in several enzymes that helps *L.lactis* to maintain the growth¹⁰. It becomes necessary as it makes taro tuber contain more protein content compared to unprocessed taro tuber where the protein content only 1.5 grams out of 100 grams³.

Total sugar content shows the increasing sugar content at 24 to 36 hours due to polysaccharides break down become more simple form of saccharides and monomers also. It detected by phenol reaction as it oxidized by sulfuric acid. Within fermentation, sugar content start to decrease which caused by acid production from sugar conversion. Carbon compound in the simple form like lactic acid makes it digest easier by human because it no need glycolysis pathway to break down glucose or other sugar compound, but lactic acid will directly enter Kreb cycle and release energy.

Organoleptic test shows that inoculum ratio of *L.mesenteroides*:*L.lactis* (v/v) 1:2 is the most preferably by panelists with the highest value at 5.067 out of 6. It caused by *L.lactis* metabolism that convert amino acids into α -cetoacids which can be transformed into aldehydes, alcohol, hydroxyl acids, and several compound that act as aroma precursors¹². *L.lactis* also has lipase activity that will produce ester compounds¹² and together with other metabolites it gives Poi unique taste and sour flavor. In addition to these results, all variation of Poi is not contain any of the fecal coliform bacteria tested by EMB selective-differential media. This is evidenced by the absence of metallic green colonies on EMB medium after incubation. It shows that overall processes of Poi fermentation is clean and safe process of manufacturing.

This research shows that fermentation not only increase nutritional value of some raw materials, but also gives new taste of the raw material itself. As both increase, economical value of



the product itself would be greater than raw material and can act as an innovative bioproduct that use bio-based technology using local natural resources of Indonesia.

Conclusions

The best optimization of the fermentation process of taro is mixing the mixed and boiled taro with water using a ratio of weight and volume ratio of 1: 1 w/v and incubated at 37°C for 4 days. This fermentation process using a 10% inoculum, *L. mesenteroides* and *L. lactis*, with age 8 hours by comparison 1:2 (v/v) which has the highest organoleptic test result with a value of 5.067 of 6. The results of this standardization can be used further as a basis for the large scale production process of fermented taro paste (poi) as an innovative bioproduct in bioprocess industries for food security in Indonesia.

Authors' contributions

JAK, UA, ANL, JNAI, and C were designed the study, carried out the laboratory work also analyzed the data. JAK and DA wrote the manuscript. PA were the mentor.

References

- A.B. Carl. "*Encyclopedia of Food Microbiology*". California, USA. 446 (2000).
- Amiruddin. Department of Agriculture Technology, University of Hasanuddin, Makassar, Indonesia (2013).
- Dorka *et al.*, 2006
- F.B. Abang and H.A. Shittu. *Journal of Agriculture and Veterinary Science.*, 8, 3 (2015).
- McDonald, L. C., H. P. Fleming, and H. M. Hassan. *Applied and Environmental Microbiology*, 56.7, 2120, (1990).
- N. Wagner, Q.H. Tran, H. Richter, P.M. Selzer, and G. Uden. *Applied and environmental microbiology.*, 71(9), 4966 (2005).
- Nutrition in a Clinical Care: The Medicinal Uses of Poi. A.C. Brown and A. Valiere An Official Publication of Tuts University, 7(2), p. 69 (2004).

- P.F. Stanbury, W. Allan and J.H. Stephen. *"Principles of Fermentation Technology, 2nd edition"*, 1984, Chap. 1, London, 1.
- P.F. Stanbury, W. Allan and J.H. Stephen. *"Principles of Fermentation Technology, 2nd edition"*, 1984, Chap. 1, London, 17.
- Samaržija, Dubravka, Neven Antunac, and Jasmina Lukač Havranek. *Mljekarstvo*. 51.1, 35 (2001).
- Suherman, Dade. (2014). *Bioindustri Umbi Talas*. Dinas Ketahanan Pangan Dan Peternakan Provinsi Jawa Barat [online] <http://bkpd.jabarprov.go.id/bioindustri-umbi-talas-2/>. Accessed at November 30, 2019.
- Wahyudi, Doni. (2010). *Pengaruh Suhu Perendaman Terhadap Kandungan Oksalat Dalam Talas Pada Proses Pembuatan Tepung Talas* [online] <http://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/61934>. Accessed at November 30, 2019.



Identifikasi Bakteri pada Telapak Tangan Teknisi Pelayanan Darah di Kabupaten Bantul Yogyakarta

Nur'Aini Purnamaningsih^{1*},
Francisca Romana Sri Supadmi¹

¹Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta
Jl Brawijaya, Ring Road Barat, Ambarketawang, Gamping, Sleman,
Yogyakarta 55294

*corresponding author: nurainipurnamaningsih21@gmail.com

Abstrak. Kebersihan tangan teknisi pelayanan darah menjadi hal yang penting. Tangan merupakan bagian tubuh yang paling sering kontak dengan dunia luar dan digunakan sehari-hari untuk melakukan aktivitas. Hal ini sangat memudahkan terjadinya kontak dengan mikrobial dan mentransferkannya ke objek lain. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui jenis bakteri pada telapak tangan teknisi pelayanan darah di UDD PMI Kabupaten Bantul Yogyakarta. Penelitian dilakukan dengan uji biokimia menggunakan BD Phoenix 100. Analisis data dilakukan secara kualitatif dengan membaca hasil pengujian biokimia setelah sampel dituangkan ke Panel NID (bakteri Gram negatif) atau Panel PID (bakteri Gram positif), dan diinkubasi pada BD Phoenix 100. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jenis bakteri yang diisolasi dari telapak tangan yaitu *Bacillus coagulans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, dan *Bacillus subtilis*.

Kata kunci: bakteri, telapak tangan, teknisi pelayanan darah

Pendahuluan

Tangan merupakan bagian tubuh yang paling sering kontak dengan dunia luar dan digunakan sehari-hari untuk melakukan aktivitas. Hal ini sangat memudahkan terjadinya kontak dengan mikrobial dan mentransferkannya ke objek lain. Penelitian Angga, Prenggono, dan Budiarti (2014) melaporkan bahwa jenis bakteri kontaminan pada tangan perawat di bangsal Penyakit Dalam RSUD Ulin Banjarmasin Periode Juni-Agustus 2014 yang paling dominan adalah bakteri Gram positif sebanyak 92,31% yaitu

Staphylococcus aureus sebanyak 53,85%, *Staphylococcus epidermidis* sebanyak 34,62% dan *Bacillus sp.* sebanyak 3,84%. Bakteri lain yang teridentifikasi adalah *Escherichia coli* sebanyak 7,69% sebagai bakteri Gram negatif. Penelitian Nogueras, M. *et al.*, (2001) menyebutkan bahwa dengan *Direct finger-print samples* kelompok petugas kesehatan yang mencuci tangan meningkat rata-rata CFU (*Colony Forming Unit*)-nya setelah pemeriksaan fisik pasien yaitu 20,7 sebelum pemeriksaan fisik pasien menjadi 115,9 setelah pemeriksaan fisik pasien, dan tidak ditemukan bakteri yang potensial patogen.

Kebersihan tangan teknisi pelayanan darah menjadi hal yang penting. Cuci tangan dan disinfeksi tangan merupakan salah satu upaya untuk pencegahan terkontaminasi bakteri. Oleh karena itu, peneliti ingin mengetahui jenis bakteri yang terdapat pada telapak tangan petugas teknisi pelayanan darah di UTD PMI Kabupaten Bantul Yogyakarta.

Metode Penelitian

Penelitian dilakukan selama 15 hari pada 16-30 September 2019 di Laboratorium Mikrobiologi Klinis, Balai Besar Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pengendalian Penyakit (BBTKL-PP Yogyakarta).

Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah BD Phoenix 100, *Biological Safety Cabinet* (BSC), autoclave, erlenmeyer, gelas beker, inkubator, jarum ose, lampu Bunsen, *hot plate stirrer*, mikropipet, gelas benda, mikroskop, *petridish*, pipet ukur, vortex, nephelometer, tabung reaksi, timbangan analitik, Panel NID, Panel PID, dan *optic lab*.

Bahan-bahan yang digunakan yaitu media *Brain Heart Infusion* (BHI), media *Tryptic Soy Agar* (TSA), media *Mac Conkey Agar* (MC), NaCl, aquadest, Gram A (Kristal Violet), Gram B (Iodine), Gram C (Etanol 95%), Gram D (Safranin), ID Broth dan alkohol 70%.



Prosedur Kerja **Pembuatan Media**

Powder BHI sebanyak 37 gram dilarutkan dalam 1 liter aquadest, dipanaskan di atas hot stirrer sampai larut, pH diatur hingga diperoleh $\text{pH } 7,4 \pm 0,2$ dengan HCl dan NaOH, kemudian masukkan ke dalam tabung bertutup ulir masing-masing ± 10 ml, disterilkan dengan autoclave tekanan 1 atm, suhu 121°C , selama 15 menit.

Powder *Tryptic Soy Agar* sebanyak 40 gram dilarutkan dalam 1 liter aquadest, dipanaskan di atas hot steerer sampai larut, pH diatur hingga diperoleh $\text{pH } 7,3 \pm 0,2$ dengan HCl dan NaOH, disterilkan ke dalam autoclave tekanan 1 atm, suhu 121°C , ditunggu sampai suhu $45-50^{\circ}\text{C}$, ditambahkan 5% darah defibrined steril, kemudian media dituangkan ke petridish masing-masing 15-20 ml dan dibiarkan beku. Setelah beku, media disimpan di tempat bersih dalam suhu 4°C .

Powder *Mac Conkey Agar* sebanyak 50 g dilarutkan dalam 1 liter aquadest, dipanaskan di atas hot stirrer sampai larut, disterilisasi dengan autoclave tekanan 1 atm, suhu 121°C selama 15 menit, ditunggu dingin sampai suhu $45^{\circ}\text{C}-50^{\circ}\text{C}$, lalu dituangkan ke petridish masing-masing 15-20 ml dan dibiarkan beku. Setelah beku, media disimpan di tempat bersih.

NaCl sebanyak 8,5% gram dilarutkan ke dalam 1 liter akuades, pH diatur hingga diperoleh $\text{pH } 7,0 \pm 0,2$ dengan HCl dan NaOH, kemudian disterilkan dengan autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit.

Preparasi dan Inokulasi Bakteri pada Medium Pengaya

Isolat bakteri yang diisolasi dari swab telapak tangan diinokulasikan ke medium pengaya *Brain Heart Infusion* (BHI) secara aseptik, lalu diinkubasi secara terbalik selama 24 jam pada suhu 37°C .

Inokulasi pada Medium Selektif

Isolat bakteri dari *Brain Heart Infusion* (BHI) diinokulasikan ke medium selektif, yaitu *Tryptic Soy Agar* (TSA) dan *Mac*

Conkey Agar (MC) dengan metode *streak plate* secara aseptik, lalu diinkubasi secara terbalik selama 24 jam pada suhu 37°C.

Inokulasi Bakteri Tersangka pada BHI

Isolat bakteri yang tumbuh pada media selektif TSA dan MC diinokulasikan ke BHI dengan cara diambil menggunakan jarum ose secara aseptik, lalu diinkubasi secara terbalik selama 24 jam pada suhu 37°C.

Uji Penegasan pada Medium Selektif

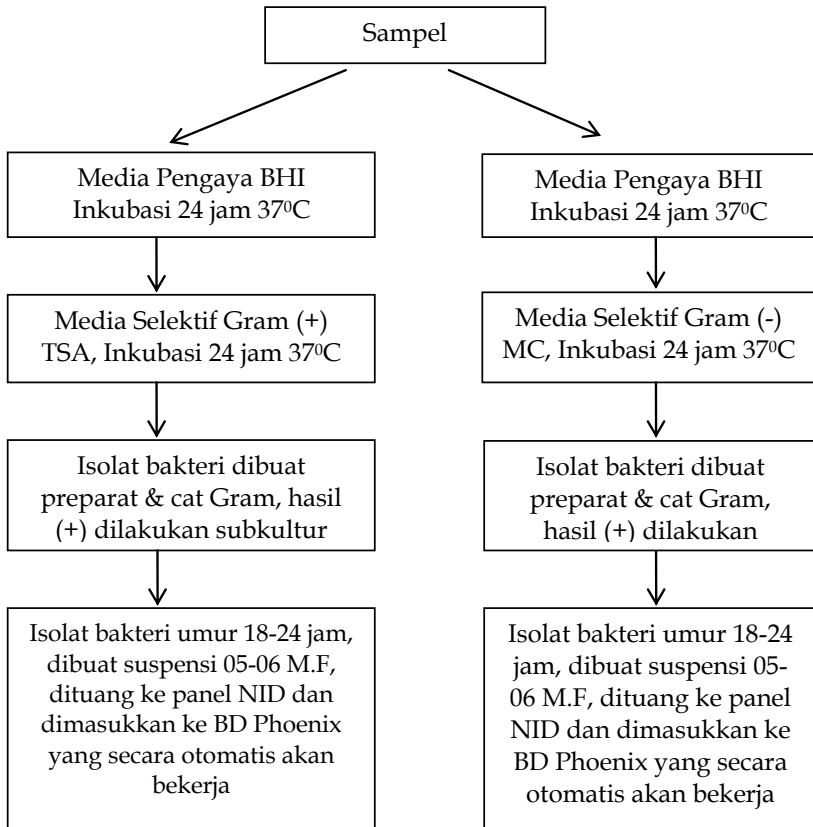
Isolat bakteri pada BHI diinokulasikan ke medium selektif dengan metode *streak plate*. Isolat yang berasal dari TSA diinokulasikan pada TSA, isolat yang berasal dari MC diinokulasikan pada MC dengan metode *streak plate* secara aseptik, lalu diinkubasi secara terbalik selama 24 jam pada suhu 37°C.

Uji Biokimia

Isolat bakteri yang tumbuh pada medium selektif TSA dan MC diambil menggunakan jarum ose secara aseptik dan dimasukkan ke ID Broth, lalu divortex hingga homogen. Suspensi bakteri di dalam ID Broth diukur tingkat kekeruhan menggunakan nephelometer (kekeruhan berkisar 0,5-0,6). Setelah mendapatkan tingkat kekeruhan yang sesuai, suspensi bakteri dituangkan ke Panel NID (bakteri Gram negatif) atau panel PID (bakteri Gram positif) dan dimasukkan ke BD Phoenix 100 untuk inkubasi sekaligus identifikasi jenis bakteri. BD Phoenix 100 mengidentifikasi jenis bakteri secara otomatis dan hasilnya ditampilkan pada layar. Hasil identifikasi yang diperoleh lalu dicetak.

Teknik Analisis Data

Analisis data dilakukan secara kualitatif dengan membaca jenis bakteri hasil pengujian biokimia setelah sampel dituangkan ke Panel NID (bakteri Gram negatif) atau Panel PID (bakteri Gram positif), dan diinkubasi pada BD Phoenix.

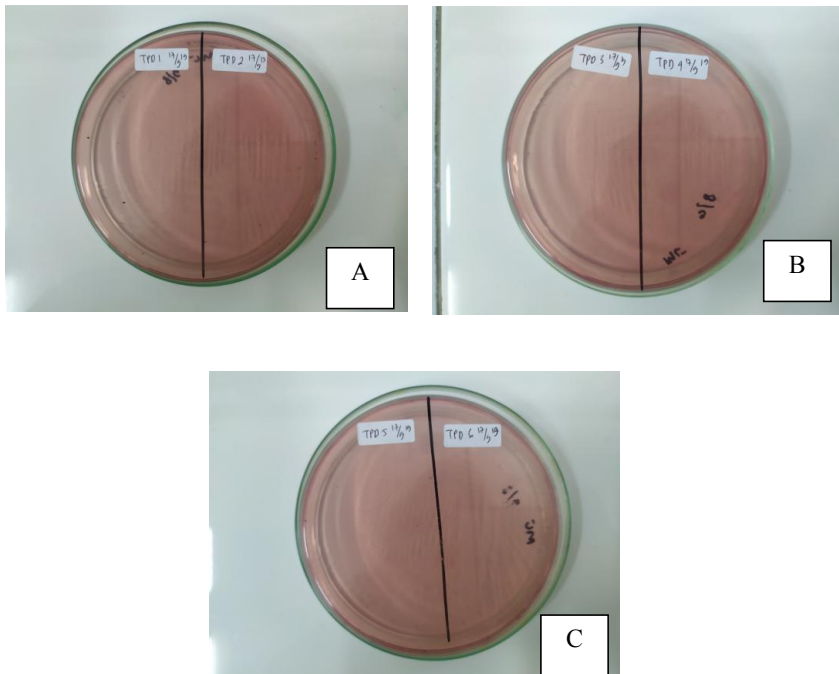


Gambar 1. Diagram Alir Penelitian

Hasil dan pembahasan

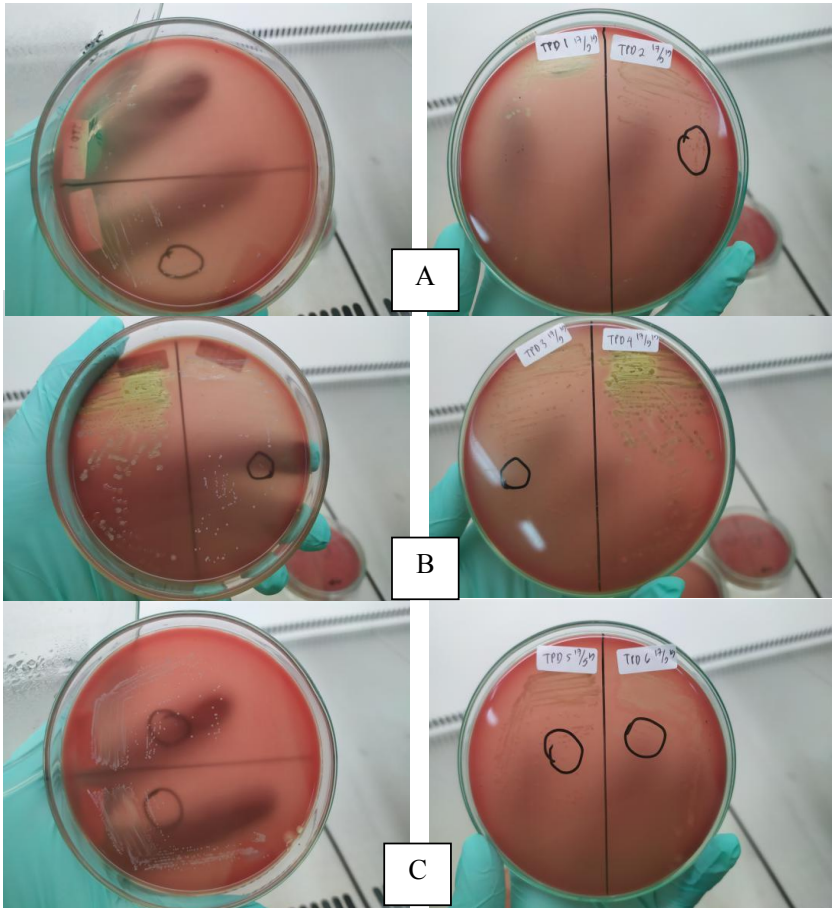
Inokulasi bakteri yang diisolasi dari telapak tangan pada medium pengaya untuk memperbanyak jumlah koloni sel bakteri dilakukan pada medium *Brain Heart Infusion* (BHI). BHI merupakan medium pengkaya pertumbuhan mikrobial yang bersifat universal, sehingga dapat digunakan pada bakteri Gram positif maupun bakteri Gram negatif (Atlas, 2004). Koloni bakteri pada medium pengaya diinokulasikan pada medium selektif untuk mengetahui karakteristik pertumbuhan secara spesifik,

dimana bakteri ditumbuhkan pada medium *Tryptic Soy Agar* (TSA) dan medium *Mac Conkey Agar* (MC). TSA agar merupakan medium selektif dan diferensial untuk menumbuhkan bakteri Gram positif, sedangkan MC agar merupakan medium selektif dan diferensial untuk menumbuhkan bakteri Gram negatif. Pertumbuhan koloni pada medium selektif TSA ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Pertumbuhan koloni bakteri pada medium selektif TSA

Pertumbuhan koloni bakteri pada medium selektif pada media *Mac Conkey Agar* diperlihatkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Pertumbuhan koloni bakteri pada medium selektif MC

Uji biokimia untuk mengidentifikasi jenis bakteri yang diisolasi dari telapak tangan menggunakan BD Phoenix. Hasil identifikasi isolat bakteri yang diisolasi dari telapak tangan ditampilkan pada Tabel 1. Dari Tabel 1 dapat dilihat hasil identifikasi dari enam isolat bakteri yang diisolasi dari telapak tangan menggunakan BD Phoenix 100 didapatkan *Bacillus*

coagulans, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, dan *Bacillus subtilis*.

Tabel 1. Hasil Uji Biokimia Isolat Bakteri yang diisolasi dari Telapak Tangan menggunakan BD Phoenix 100

No.	Kode Isolat	Jenis Bakteri
1.	TPD1	<i>Bacillus coagulans</i>
2.	TPD2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
3.	TPD3	<i>Staphylococcus warneri</i>
4.	TPD4	<i>Bacillus subtilis</i>
5.	TPD5	<i>Staphylococcus warneri</i>
6.	TPD6	<i>Staphylococcus warneri</i>

Staphylococcus epidermidis merupakan flora normal pada kulit dan mukosa manusia, bakteri ini dapat ditemukan pada manusia sejak usia neonatus. Bakteri *Staphylococcus epidermidis* dapat hidup pada kulit saluran pernafasan bagian atas manusia, di rongga mulut, serta saluran cerna manusia. Ditemukannya *Staphylococcus epidermidis* pada tangan merupakan hasil yang normal. Namun, jika bakteri ini berpindah ke tempat lain, maka dapat menyebabkan infeksi (Jawetz *et al.*, 2007).

Faktor utama virulensi *Staphylococcus epidermidis* adalah membentuk biofilm pada peralatan medis. Biofilm merupakan suatu kapsul yang menyelimuti bakteri sehingga bakteri menjadi tahan terhadap sterilitas alat medis. Kapsul *Staphylococcus epidermidis* dikenal sebagai *Polysaccharide Intercellular Adhesion (PIA)* terdiri dari polisakarida sulfat yang dapat menurunkan aktivitas metabolisme bakteri sehingga menyebabkan penurunan metabolisme dan menyebabkan gangguan difusi antibiotik, sehingga antibiotik sulit untuk merusak bakteri ini (Fitzpatrick *et al.*, 2005).

Jenis *Bacillus spp.* menunjukkan bentuk koloni yang berbeda-beda pada medium agar. Warna koloni pada umumnya putih sampai kekuningan, tepi koloni umumnya tidak rata, permukaannya kasar, dan tidak berlendir. Bentuk koloni dan



ukurannya sangat bervariasi tergantung jenisnya (Hatmanti, 2000).

Bacillus subtilis ditemukan pada *swab* telapak tangan, hal ini dikarenakan bakteri ini dapat beradaptasi pada perubahan suhu lingkungan ekstrim dengan membentuk endospora. *Bacillus subtilis* ialah bakteri Gram positif yang dapat ditemukan dimana saja, udara, tanah dan tanaman. Bakteri ini dapat ditemukan pada tubuh manusia, terutama di kulit dan saluran pencernaan. Bakteri ini dapat memproduksi toksin yang menyebabkan alergi yaitu subtilisin (Kirk, 2009).

Tindakan pencegahan kontaminan bakteri pada telapak tangan dapat dilakukan tindakan seperti menjaga kebersihan tangan dengan cara mencuci tangan sebelum kontak secara langsung dengan pendonor, sesudah kontak dengan pendonor, dan setelah kontak dengan alat yang digunakan. Selain itu, teknik mencuci tangan yang baik dan benar sangat penting untuk mencegah kontaminasi. Pemetaan bakteri juga dapat mencegah kontaminasi dengan pemilihan antibakteri yang sesuai dengan bakteri yang terdapat di lingkungan tersebut.

Kesimpulan

Jenis bakteri yang diisolasi dari telapak tangan yaitu *Bacillus coagulans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, dan *Bacillus subtilis*.

Daftar Pustaka

- Angga, I., Prenggono, M.D., dan Budiarti, L.Y., 2014. Identifikasi Jenis Bakteri Kontaminan pada Tangan Perawat di Bangsal Penyakit Dalam RSUD Ulin Banjarmasin Periode Juni-Agustus 2014. *Berkala Kedokteran*, Vol.11, No.1, Feb 2015
- Atlas, R.M. 2004. *Handbook of Microbiological Media*. 3rd ed. Florida: CRC Press
- Bridson, E.Y. 1998. *The Oxoid Manual 8th Edition*. England: Oxoid Limited Hampsire

- CDC. 2002. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. Morbidity and Mortality Weekly Report October 25, 2002; 51(RR-16).
- Darmadi., *Infeksi Nosokomial. Problematika dan Pengendaliannya*. Penerbit Salemba Medika. Jakarta. 2008. hal 6-7,13-15,27, 67-80.
- Fierer N, Costello EK, Lauber CL, Hamady M, , Gordon JI, *et al.*, (2009) Bacterial variation in human body habitats across space and time. *Science* 326: 1694– 1697. Doi:10.1126/science.1177486.
- Fitzpatrick F, Humphreys H, O’Gara JP. 2005. The Genetics of Staphylococcal Biofilm Formation Will a Greater Understanding of Pathogenesis Lead to Better Management of Device Related Infection. *Clinical Microbial Infection*. 967-73.
- Girou, E, Loyeau,S, Legrand,P, Oppein,F, Buisson,CB. 2002. Efficacy of Handrubbing with an AlcoholBased Solution versus Standard Handwashing with Antiseptic Soap: randomised clinical trial. *BMJ* 325 : 362-5
- Hatmanti A. Pengenalan *Bacillus spp.* Oseana. 2000; 25(1): 31-41.
- Holt, *et al.*, 1994. *Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition*. USA: Williams and Wilkins
- Jawetz, Melnick, and Adelberg’s. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*, Alih Bahasa oleh Mudihardi, E.Kuntaman, Wasito, E.B., Mertaniasih, N.M., Harsono, S., dan Alimsardjono, L., Penerbit : Salemba Medika. Jakarta.
- Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. 2007. *Mikrobiologi Kedokteran Edisi 23*. Jakarta: EGC
- Kirk, E. *Bacillus subtilis*. 2009. Diakses dari http://web.mst.edu/~microbio/BIO_221_2009/B_subtilis.html pada tanggal 20 November 2019
- Nogueras M, *et.al*. 2001. Importance of Hand Germ Contamination in Health-Care Workers as Possible Carriers of Nosocomial Infections. *Rev. Inst. Med. Trop. S Paulo. São Paulo* May/ June; 43 (3).



- Salasial SIO, MH Wibowo, Khusnan. Karakterisasai Fenotipe Isolat *Staphylococcus aureus* dari sampel susu sapi perah mastitis suklinis. J. Sainvet 2005; 23:2.
- Supeni, Meila dan Inayati Habib. 2009. *Hubungan antara perilaku cuci tangan perawat dengan pertumbuhan bakteri aerob penyebab infeksi Nosocomial*. Publikasi UMY Vol 8 no 9. Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

Uji Toksisitas Subkronis Ekstrak Metanol Kulit Buah Kopi Arabika (*Coffea Arabica* L.) pada Ginjal Mencit (*Mus Musculus* L.) Galur BALB/c

Rita Maliza^{1*}, Alimuddin Tofrizal², Haris Setiawan¹,
Stephanie Fadilatun Humairah Piliang¹

¹Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan,
Universitas Ahmad Dahlan

²Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas
Andalas, Padang, Sumatra Barat

*Corresponding author: ritamaliza@bio.uad.ac.id

Abstrak. Kulit buah kopi diketahui mengandung senyawa dan aktivitas antioksidan meliputi antosianin, polifenol, betakaroten, dan vitamin C yang sangat bermanfaat bagi kesehatan. Kulit buah kopi saat ini sudah banyak diolah menjadi makanan dan minuman fermentasi. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemberian ekstrak metanol kulit buah kopi arabika (*Coffea arabica* L.) yang diberikan secara oral terhadap histopatologi organ ginjal mencit putih. Ekstrak metanol kulit kopi arabika didapatkan dengan metode maserasi. Ekstrak dilarutkan dengan variasi konsentrasi dosis 75, 250, 500, dan 1000 mg/kg BB sesuai dengan jumlah kelompok uji, serta akuades sebagai kelompok kontrol. Perlakuan dilakukan secara oral selama 28 hari (n=5 untuk setiap masing kelompok). Pada hari ke-29 mencit dikorbankan dan dilakukan pembedahan untuk pengambilan organ ginjal. Ginjal difiksasi dan dibuat sediaan preparat histopatologi dengan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE). Hasil menunjukkan terdapat efek toksisitas pada jaringan organ ginjal mencit secara mikroskopik dengan meningkatnya jumlah nekrosis sel pada kelompok perlakuan 1000 mg/kg BB ($P<0,05$), serta adanya infiltrasi sel radang dan hemoragi pada kelompok perlakuan dosis diatas 75 mg/kg BB. Disimpulkan bahwa ekstrak kulit buah kopi arabika (*Coffea arabica* L.) pada dosis 1000 mg/kg BB memberikan efek gejala toksik terhadap gambaran mikroskopik ginjal mencit putih setelah 28 hari perlakuan.

Kata Kunci: Uji toksisitas, toksisitas subkronis, *Coffea arabica*, kulit buah kopi, ginjal



Pendahuluan

Indonesia merupakan negara tropis yang sangat potensial untuk pengembangan komoditas primer perkebunan. Salah satu komoditas primer perkebunan utama Indonesia adalah kopi. Indonesia merupakan negara produsen kopi terbesar keempat di dunia setelah Brazil, Vietnam dan Kolombia (AEKI, 2013). Kopi ini dihasilkan dari perkebunan kopi yang luasnya mencapai 1,3 juta hektar (Hartono, 2013). Tanaman kopi umumnya berasal dari benua Afrika dan mempunyai banyak varietas. Di seluruh dunia, kini terdapat sekitar 4.500 jenis kopi (ICO, 2013). Kopi di Indonesia diekspor sekitar 67% dari total produksi, sedangkan sisanya 33% digunakan untuk memenuhi kebutuhan kopi dalam negeri (AEKI, 2013).

Hasil dari limbah pengolahan buah kopi berupa daging buah sebesar 42,20% dan kulit biji sebesar 5,90% dengan total produksi limbah tersebut sebesar 48,10% dari produksi buah basah (Londra *et al.*, 2007). Bubur kulit buah kopi basah mengandung karbohidrat 21-32%, protein 5-15%, lemak 2-7%, mineral 9% dan juga senyawa metabolit sekunder berupa kafein, tanin, senyawa antioksidan seperti fenolik, flavonoid dan polifenol, asam *p-hydroxybenzoic*, asam *chlorogenic*, asam *ferulic* dan asam *caffeic* (Blinova *et al.*, 2017; Ameza *et al.*, 2018). Kandungan tanin dari kulit buah kopi telah terbukti menginduksi apoptosis dari sel kanker (Rice-Evans *et al.*, 1997) dan katekin dapat menurunkan kadar kolesterol pada hewan uji tikus Wistar (Bursill *et al.*, 2000). Adanya kandungan bioaktif polifenol sebagai sumber antioksidan, menjadikan kulit kopi memberikan manfaat kesehatan tambahan (Geremu *et al.*, 2016).

Martinez-Saez *et al.*, (2014) melakukan penelitian tentang minuman antioksidan untuk pengendalian berat badan yang dibuat dari bubuk kulit kopi, karena rendahnya konsentrasi gula reduksi, nilai indeks glikemik, dan tinggi serat, minuman dari kulit buah kopi sangat bagus dalam diet penderita obesitas atau diabetes. Manfaat kulit buah kopi dibidang kesehatan sudah banyak dilaporkan, tetapi keamanan kulit buah kopi untuk dikonsumsi sangatlah penting. Untuk mengevaluasi suatu zat kimia perlu dikenali bahayanya dengan mengumpulkan

dan menyusun data toksisitas. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemberian ekstrak metanol kulit buah kopi arabika (*Coffea arabica* L.) yang diberikan secara oral terhadap histopatologi organ ginjal mencit putih.

Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas (Pyrex), satu set alat bedah, syringe 0,5 ml, mikropipet (Socorex), rotary evaporator (Heidolph), spektrofotometer microlab 300 (chemistry analyzer), centrifuge EBA 200 (Hettich), dan mikroskop Olympus CX 33. Bahan yang digunakan adalah kulit buah kopi arabika (*Coffea arabica* L.) yang diperoleh dari petani perkebunan kopi Desa Tegalmulyo, Kecamatan Tegalrejo, Kabupaten Klaten, Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta dengan tingkat kematangan *Over Ripe*, Metanol 96%, Hewan Uji mencit betina (*Mus musculus* L.) galur BALB/c yang berasal dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM, Yogyakarta, Buffer Neutral Formalin (BNF) 10%, Pewarnaan Hematoksilin-Eosin, Xylen, Alkohol 70%.

Persiapan Hewan Uji

Penyiapan Hewan Uji percobaan yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus* L.) betina galur BALB/c berumur 6-8 minggu dengan berat badan 20-30 g sebanyak 25 ekor. Hewan Uji ditempatkan di dalam kandang dengan kriteria suhu ruang $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, penerangan 12 jam terang dan 12 jam gelap. Sebelum digunakan, semua mencit diaklimatisasi selama 7 hari, makanan dan minuman hewan uji diberikan secara *ad libitum*. Mencit yang digunakan adalah mencit dalam keadaan nulipara (belum pernah melahirkan), tidak hamil dan tidak mengalami perubahan berat badan lebih dari 10% serta secara visual menunjukkan perilaku yang normal.

Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Kopi Arabika (*Coffea arabica* L.)

Kulit buah kopi arabika (*Coffea arabica* L.) segar dicuci dan dikeringkan dengan metode kering angin lalu dihaluskan.



Pembuatan ekstrak kulit buah kopi arabika (*Coffea arabica* L.) menggunakan metode maserasi dengan melarutkan simplisia ke dalam pelarut metanol 96%. Setelah itu dilakukan evaporasi dengan alat *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak berupa semi padatan dari kulit buah kopi arabika (*Coffea arabica* L.).

Uji Toksisitas Subkronis dan Pembuatan Preparat Jaringan Organ Ginjal

Pengujian toksisitas subkronis mengacu pada ketentuan BPOM. Hewan Uji dibagi menjadi 5 kelompok, perlakuan dosis ekstrak metanol kulit buah kopi arabika (*Coffea arabica* L.) setiap kelompok yaitu 75 mg/kg BB (P1), 250 mg/kg BB (P2), 500 mg/kg BB (P3), dan 1000 mg/kg BB (P4) serta *Aquadest* (K0), diberikan sebanyak 500 μ l selama 28 hari (BPOM 2014). Pada hari ke-29, Hewan Uji dikorbankan secara dislokasi vertebre cervicalis. Dilakukan pembedahan untuk pengambilan organ ginjal kemudian dicuci dengan NaCl 0,9%. Organ ginjal difiksasi dengan BNF 10% untuk pembuatan preparat histopatologi dan dilanjutkan dengan pewarnaan Hematoksin-Eosin. Parameter yang diamati yaitu nekrosis sel, infiltrasi sel radang, serta hemoragi terhadap sel tubulus ginjal mencit.

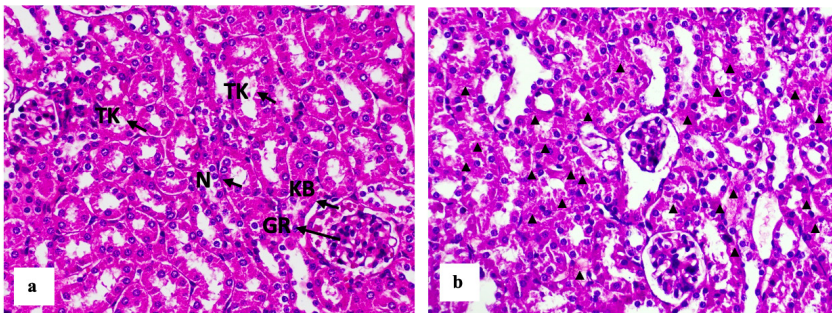
Analisis Data

Data disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SD. Analisis statistik menggunakan metode *One Way Anova* untuk data parametrik. Guna melihat perbedaan lebih lanjut antara kelompok, dilakukan uji dengan metode Duncan untuk data parametrik. Semua analisis statistik dilakukan menggunakan program SPSS 25 pada tingkat kepercayaan 95% ($p=0,05$). Data deskriptif hemoragi dan infiltrasi sel radang dianalisis dengan membandingkan antara kelompok perlakuan terhadap kelompok kontrol.

Hasil dan Pembahasan

Ginjal merupakan organ vital bagi tubuh yang dijadikan sebagai parameter pengamatan untuk uji toksisitas suatu obat atau senyawa aktif. Ginjal memiliki fungsi dalam mengatur

keseimbangan asam basa, mengatur osmolaritas tubuh serta mensekresikan zat terlarut dan membuang hasil metabolisme sehingga zat-zat yang kiranya tidak berguna bagi tubuh akan dibawa ke ginjal dalam jumlah yang besar. Hasil pengamatan preparat histologis ginjal mencit (*Mus musculus* L.) galur BALB/c setelah pemberian ekstrak metanol kulit buah kopi arabika (*Coffea arabica* L.) selama 28 hari menunjukkan adanya kerusakan pada sel-sel tubulus ginjal berupa peningkatan nekrosis sel (Gambar 1), hemoragi dan peradangan pada dosis 500 dan 1000 mg/kg BB.



Gambar 1. Gambaran mikroskopik jaringan ginjal kelompok kontrol (a) dan kelompok perlakuan dosis 1000 mg/kg BB (b). Terlihat nekrosis sel yang terjadi pada sel-sel tubulus ginjal (segitiga hitam). Hematoksilin-eosin 400x. Keterangan: N = Sel Normal, GR= Glomerulus, KB= Kapsula Bowman, TK= Tubulus Kontortus.

Hasil pengamatan mikroskopis jaringan ginjal pada kelompok perlakuan dosis 1000 mg/kg BB memperlihatkan adanya kerusakan nekrosis sel yang ditandai dengan membran sel membengkak, sitoplasma berwarna pink dan epitel yang lebih tipis dibandingkan dengan gambar kelompok kontrol. Ketika senyawa aktif yang bersifat toksik dalam konsentrasi tinggi masuk ke dalam sel, maka akan menyebabkan kondisi di sekitar sel berubah menjadi ekstrim yang menyebabkan terjadinya penurunan integritas dinding sel sehingga terjadi pembengkakan, kemudian inti sel akan mengecil dan berwarna biru akibat adanya penggumpalan kromatin inti (piknosis),



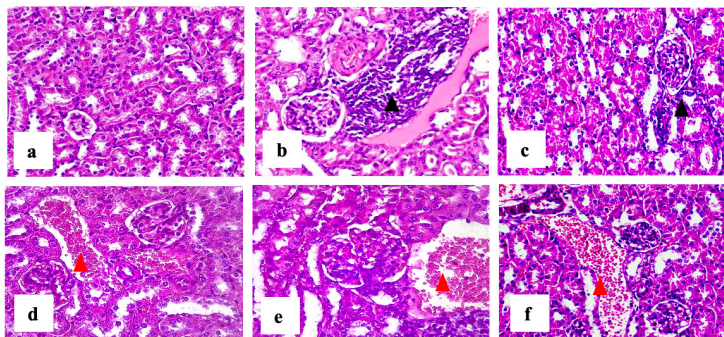
inti sel juga bisa hancur (karyoreksis) dan sampai menghilang (karyolisis). Kerusakan yang terjadi pada jaringan ginjal diduga akibat tingginya konsentrasi senyawa aktif seperti tannin, alkaloid, dan saponin yang terkandung dalam ekstrak metanol kulit buah kopi arabika (*Coffea arabica* L.). Pada perlakuan dosis 1000 mg/kg BB, terjadi pelebaran ruang Bowman diakibatkan oleh atrofi glomerulus, yaitu menurunnya ukuran jaringan yang disebabkan oleh berkurangnya jumlah sel karena nekrosis atau berkurangnya ukuran sel yang mungkin terjadi karena lambatnya sirkulasi atau terjadi kekurangan oksigen di jaringan (hipoksia) (Al-Tameemi 2016). Kerusakan ini menyebabkan terganggunya proses filtrasi darah yaitu berkurangnya kemampuan dalam proses penyaringan darah, sehingga sel darah dan protein tertimbun pada tubulus karena didapat lolos bersamaan dengan urin. Analisis kuantitatif terhadap nekrosis sel pada tubulus ginjal dilakukan dengan memperoleh penilaian proporsi nekrosis sel pada tubulus ginjal per lapang pandang. Berdasarkan pengujian statistik *One Way Anova* untuk proporsi nekrosis sel pada tubulus ginjal dengan berbagai dosis perlakuan menunjukkan adanya beda nyata secara signifikan ($P < 0,05$) terhadap nekrosis sel yang terjadi jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penilaian proporsi nekrosis sel pada tubulus ginjal dapat dilanjutkan dengan *post hoc test* menggunakan Duncan (Tabel 1). Berdasarkan uji lanjut Duncan, diperoleh hasil tertinggi berada pada dosis 1000 mg/kg BB yang kemudian diikuti oleh dosis 500, 250 dan 75 mg/kg BB. Pemberian ekstrak daun ashitaba (*Angelica keskei*) pada dosis 125, 250, serta 500 mg/kg BB terhadap histopatologi jaringan ginjal mencit ditemukan adanya infiltrasi sel radang (Adinata *et al.*, 2012). Peradangan tersebut diduga dapat terjadi akibat dari tingginya konsentrasi zat asing yang masuk ke dalam jaringan. Semakin tinggi konsentrasi suatu senyawa yang diberikan, maka respons toksik yang ditimbulkan semakin besar (Amalina, 2009).

Tabel 1. Rerata nekrosis sel terhadap setiap kelompok perlakuan pemberian ekstrak metanol kulit buah kopi arabika (*Coffea arabica* L.)

Kelompok	Rerata jumlah nekrosis sel
0 kg/BB (kontrol)	0,090±0,010 ^e
75 kg/BB	0,170±0,000 ^d
250 kg/BB	0,213±0,005 ^c
500 kg/BB	0,313±0,020 ^b
1000 kg/BB	0,576±0,288 ^a

Keterangan: Mean ± SD. ^{a-e} Perbedaan notasi pada angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan perbedaan secara signifikan (P<0,05)

Kerusakan sel berupa peradangan dan hemoragi tampak pada gambaran histopatologi ginjal mencit pada pemberian dosis 250, 500 dan 1000 mg/kg BB (Gambar 2). Inflamasi atau reaksi peradangan merupakan mekanisme penting sel yang diperlukan tubuh untuk mempertahankan diri dari berbagai bahaya yang dapat mengganggu keseimbangan, juga memperbaiki struktur serta gangguan fungsi jaringan yang ditimbulkan (Baratawidjaja, 2002). Peradangan yang terjadi pada dosis 500 dan 1000 mg/kg BB merupakan inflamasi kronik yang dapat berlanjut pada nekrosis sel. Peradangan merupakan salah satu ciri awal akan terjadinya nekrosis sel (Amalina, 2009).



Gambar 2. Gambaran mikroskopik jaringan ginjal kelompok normal (a), perlakuan ekstrak dosis 500 mg/kg BB (b dan e), 250 mg/kg BB (d) dan 1000 mg/kg BB (c dan f) memperlihatkan infiltrasi sel radang (panah hitam) dan hemoragi (panah merah). Hematoksilin-eosin 400x.



Hemoragi merupakan keluarnya atau terdapatnya sel darah merah (eritrosit) diluar pembuluh darah yang secara mikroskopik akan terlihat sel-sel darah yang berada dalam jaringan (Berata *et al.*, 2014). Penyebab hemoragi disekitar jaringan ginjal pada dosis 250, 500, dan 1000 mg/kg BB diduga terjadi akibat tingginya konsentrasi metabolit sekunder saponin yang terkandung di dalam ekstrak metanol kulit buah kopi arabika (*Coffea arabica* L.). Saponin dapat menurunkan permeabilitas membran sel pembuluh darah vena, arteri, maupun kapiler, sehingga dapat terjadi kebocoran yang menyebabkan sel darah merah keluar dan berada pada jaringan. Hemoragi juga merupakan bagian dari proses inflamasi jaringan akibat kerusakan pembuluh oleh reaksi inflamasi akibat infiltrasi sel radang.

Berdasarkan hasil pengamatan secara mikroskopik, dosis 75 mg/kg BB merupakan dosis yang tidak memberikan efek toksik setelah perlakuan 28 hari, baik itu meningkatnya jumlah nekrosis sel, peradangan dan hemoragi jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1000 mg/kg BB.

Kesimpulan

Dosis 1000 mg/kg BB pemberian ekstrak metanol kulit buah kopi arabika (*Coffea arabica* L.) secara oral pada mencit putih memberikan efek toksik terhadap sel tubulus ginjal yang berupa nekrosis sel, infiltrasi sel radang, dan hemoragi setelah 28 hari perlakuan.

Daftar Pustaka

- AEKI (Asosiasi Eksportir Kopi Indonesia) [Internet]. 2013. Perkembangan ekspor & impor kopi tahun 2007-2013. [tempat tidak diketahui]: AEKI; [diakses 5 Mei 19]. Tersedia dari: <http://www.aeki-aice.org/page/realisasi-eksport-impor-kopi-indonesia-/id>
- Adinata MO, IW Sudira, dan IK Berata. 2012. Efek ekstrak daun ashitaba (*Angelica keiskei*) terhadap gambaran histopatologi ginjal mencit (*Mus musculus*) jantan. Buletin Veteriner Udayana. Bali. 4(2) : 55-62.

- Al-Tameemi MSS, Thekra TAA, Hanan RA, Enas MN, Shuaa SA, Gamal SG, Awatif AM, and Ban AN. 2016. Studies on acute toxicity (LD50) and histopathological effects of methanolic and aqueous *Conocarpus lancifolius* extracts in mice. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research*. 7(4) : 243-253.
- Amalina N. 2009. Uji toksisitas akut ekstrak valerian (*Valeriana officinalis*) terhadap hepar mencit balb/c [Karya tulis ilmiah]. [Semarang]: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Ameca GM, EOC Maria, ZC Pedro, DC Antonio, SH Marcos, HH Jose. 2018. Chemical composition and antioxidant capacity of coffee pulp. *Ciência E Agrotecnologia*. 42(3) : 307-313.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan [BPOM]. 2014. Peraturan kepala badan pengawas obat dan makanan republik Indonesia Nomor 7 Tahun 2014 tentang pedoman uji toksisitas nonklinik secara in vivo. Jakarta : Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- Badan Pusat Statistik. 2009. Ekspor kopi Indonesia berdasarkan negara tujuan utama. Jakarta : BPS.
- Baratawidjaja. 2002. *Imunologi dasar*. Jakarta : Fakultas kedokteran Universitas Indonesia.
- Berata IK, IBO Winaya, AAAM Adi, dan IBW Adnyana. 2014. *Patologi veteriner umum*. Cetakan ke-2. Denpasar : Penerbit Swasta Nulus.
- Blinova L, S Maros., B Alica, S Maros. 2017. Review: Utilization of waste from coffee production. *Research Papers*. 25(40) : 95.
- Bursill CA, *et al.*, 2000. Green tea catechins beneficially modify cholesterol metabolism in the hypercholesterolaemic rabbit. *Atherosclerosis*. 151(1) : 109.
- Duangjai A, dkk. 2016. Comparison of antioxidant, antimicrobial activities and chemical profiles of three coffee (*Coffea arabica* L.) pulp aqueous extracts. *Integr Med Res*. 5 : 324-331.
- Geremu M, *et al.*, 2016. Extraction and determination of total polyphenols and antioxidant capacity of red coffee (*Coffea arabica* L.) pulp of wet processing plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 3 : 25-30.



- Guyton AC, dan JE Hall. 2007. Buku ajar fisiologi kedokteran. Edisi XI. Jakarta : EGC.
- Hartono. 2013. Siaran pers produksi kopi nusantara ketiga terbesar di dunia. [tempat tidak diketahui] : Kementerian Perindustrian (Kemenperin).
- Henzani G. 2018. Pengaruh penambahan minyak zaitun pada kopi sebagai masker untuk perawatan kulit wajah kering. Padang : Universitas Negeri Padang.
- ICO [Internet]. 2013. International coffee organization. [tempat tidak diketahui]: ICO; [diakses 5 Mei 19]. Tersedia dari: <http://www.ico.org>.
- Kumalaningsih S. 2006. Antioksidan alami: Penangkal radikal bebas, sumber, manfaat, cara penyediaan dan pengolahan. Surabaya : Trubus Agrisarana.
- Londra IM, Andri KB. 2007. Potensi pemanfaatan limbah kopi untuk pakan penggemukan kambing peranakan etawah. Makalah di dalam Seminar Nasional Inovasi untuk Petani dan Peningkatan Daya Saing Produk Pertanian. Malang : [penerbit tidak diketahui].
- Martinez-Saez N, *et al.*, 2014. A novel antioxidant beverage for body weight control based on coffee silverskin. Food Chem. 150 : 227-234.
- Pringgoutomo S, S Himawan, A Tjarta. 2002. Buku ajar patologi I. Jakarta : Sagung Seto.
- Rice-Evans C, *et al.*, 1997. Flavonoids in health and disease. New York : Dekker.

Pengaruh Konsentrasi Minyak Serai terhadap Karakteristik *Biodegradable Film* dari Rumput Laut *Kappaphycus Alvarezii*

Rudi Dungani¹, Pingkan Aditiawati¹, Julia Lumbansiantar^{1,*}, Safar Doddy²

¹Program Studi Teknologi Pascapanen, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung,
Jl. Ganesha no. 10, Bandung, Indonesia 40132

²Pusat Penelitian Oseanografi LIPI

*Corresponding author: jfransiska.jl@gmail.com

Abstrak. Salah satu cara untuk mencegah pembusukan makanan atau bioproduk adalah dengan mengemas. Kebanyakan kemasan terbuat dari plastik yang sulit terurai sehingga diperlukan alternatif lain seperti *biodegradable film*. Rumput laut dapat digunakan sebagai bahan alternatif lain untuk membuat film karena memiliki polisakarida. Polisakarida diperoleh dengan mengekstraksi rumput laut dengan etanol. Polisakarida kemudian dilarutkan dalam akuades bersama sorbitol dan PVA sebagai *plasticizer*. Minyak serai ditambahkan pada film rumput laut sebagai antimikroba pada film dengan konsentrasi minyak serai 0%, 1%, 3%, dan 5%. Tween 80 sebanyak 1% dimasukkan ke larutan film untuk melarutkan minyak serai. Larutan film didiamkan selama tiga hingga empat hari dalam ruangan untuk memperoleh film dalam kondisi kering. Karakteristik film yang dianalisis adalah morfologi permukaan film yang dianalisis menggunakan Scanning Electron Microscope (SEM), kemampuan antimikroba film, dan kemampuan film terdegradasi dalam tanah. Morfologi permukaan film dengan konsentrasi minyak atsiri menunjukkan permukaan yang berpori. Hasil pengujian antimikroba film menunjukkan film dengan konsentrasi minyak serai 1% sudah dapat menghambat pertumbuhan *E.coli* dan *S.aureus*. Film dengan minyak serai lebih cepat terurai dibandingkan film tanpa minyak serai.

Kata kunci: minyak serai, morfologi, antimikroba, biodegradasi, rumput laut



Pendahuluan

Pertumbuhan mikroba pada permukaan makanan atau bioproduk segar menjadi salah satu permasalahan besar penyebab kebusukan produk (Ojagh *et al.*, 2010). Kontaminasi mikroba dapat memperpendek umur simpan makan dan meningkatkan resiko keracunan makanan. Kebanyakan makanan dinyatakan sudah busuk ketika jumlah mikroba mencapai 10^7 CFU/g. Ketika sudah melewati 10^8 CFU/g, produk akan mulai mengeluarkan bau (Sung *et al.*, 2013). Salah satu cara menghambat pertumbuhan mikroba pada makanan adalah mengemasnya. Namun, banyak kemasan masih terbuat dari plastik. Plastik merupakan kemasan yang sangat susah untuk didegradasi alam. Sekitar 4.8 – 12.7 juta ton sampah berada dilaut dan masih akan bertambah. Untuk itu, diperlukan alternatif kemasan yang dapat didegradasi oleh alam.

Rumput laut menjadi salah satu bahan utama untuk menggantikan kemasan plastik karena mengandung 20% hingga 76% polisakarida dan karbohidrat dalam kondisi kering. Abdul Khalil *et al.* (2017) mengatakan rumput laut berpotensi menjadi materi polimer pembentuk film dilihat dari kompatibilitas, biodegradasi dan bioekonomi.

Kemampuan minyak atsiri dalam melindungi makanan dari mikroorganisme sudah banyak diteliti dan dikembangkan ke dalam pembuatan kemasan (Tongnuanchan *et al.*, 2014; Acevedo-Fani *et al.*, 2015; Atares dan Chiralt, 2016; Ojagh *et al.*, 2010). Minyak atsiri merupakan senyawa komponen volatil yang dibentuk dari metabolit sekunder pada tanaman (Tongnuanchan *et al.*, 2014). Serai mengandung citral yang termasuk senyawa monoterpene aldehid (Saddiq dan Khayyat, 2010) dan biasa digunakan oleh industri pewangi, farmasi dan senyawa bioaktif karena memiliki aroma yang khas. Serai menunjukkan potensi sebagai antibakteri yang mampu menekan *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, dan *Staphylococcus aureus*. Antibakteri pada serai dapat mengurangi laju perubahan pH pada daging dengan konsentrasi tertentu (Gumilar *et al.*, 2017).

Penelitian ini bertujuan untuk membuat kemasan atau film dari rumput laut dengan penambahan minyak serai sebagai

antimikroba. Film tersebut merupakan *active packaging* karena memiliki komponen antimikroba yang dapat menghambat laju pertumbuhan bakteri dan menghambat pembusukan. Film perlu ditentukan karakteristiknya dan pengaruh konsentrasi serai pada film.

Metode Penelitian

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah akuades, cakram Kirbi-Bauer, kertas Whatmann no. 3, minyak serai, *polyvinyl alcohol* (PVA), dan rumput laut *Kappaphycus alvarezii*.

Persiapan rumput laut dan ekstraksi

Rumput laut diperoleh dari perairan pulau Ternate, Indonesia. Rumput laut dibersihkan dengan air laut dan air tawar kemudian dikeringkan dengan bantuan sinar matahari selama satu hari. Rumput laut kemudian dikemas dengan plastik dan disimpan pada tempat kering dan gelap.

Sebanyak 100 g rumput laut yang telah kering udara diblender kemudian disaring. Hasil saringan kemudian dilarutkan dalam akuades 2000 ml dan diautoklaf. Selanjutnya, larutan diberi etanol 96% sebanyak 4000 ml. Larutan yang diperoleh kemudian disaring menggunakan kertas Whatman no. 2. Filtrat yang diperoleh dicuci sebanyak tiga kali menggunakan etanol 96%. Filtrat kemudian dikeringkan pada suhu 80°C lalu ditimbang hasilnya.

Pembuatan Film

Pembuatan film melibatkan filtrat rumput laut, PVA, sorbitol, dan minyak serai mengikuti metode *Ojagh et al.*, (2010) yang dimodifikasi. Sebanyak 1.6% filtrat rumput laut, PVA 1.5%, dan sorbitol 1.5% dilarutkan dalam 100 ml akuades selama 3 jam pada suhu 80°C. Selanjutnya, dimasukkan minyak serai dengan konsentrasi 0%, 1%, 3%, dan 5% yang telah diberikan Tween 80 sebanyak 1%. Larutan kemudian dituang dalam loyang berukuran 20x20 cm dengan ketebalan larutan 0,5 cm dan didinginkan selama 3-4 hari.



Morfologi permukaan film

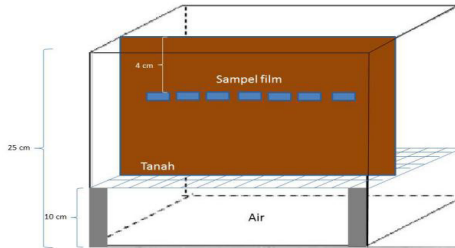
Film rumput laut yang telah terbentuk kemudian dianalisis permukaannya dengan SEM JSM-6510A/JSM6510LA. Sampel film berukuran $0.5 \times 0.5 \text{ cm}^2$ dilapisi dengan emas (Au) untuk diuji dengan SEM. Emas digunakan untuk melapisi sampel karena sampel bukan bahan konduktor. Perbesaran 500x dan 2000x dengan tegangan 20kV digunakan untuk menganalisis permukaan film yang terbentuk.

Uji Antimikroba

Parameter pengujian antimikroba dilakukan dengan pendekatan Kirby-Bauer atau *disk diffusion* untuk didapatkan zona hambatnya. *Eschericia coli* dan *Staphiloccoccus aureus* sebagai mikroorganisme yang digunakan untuk pengujian. Kultur mikroba diinokulasi pada 50 ml *nutrient broth* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu malam. Sebanyak 1 ml dari kultur diarturkan hingga konsentrasi 10^{-7} dan 10^{-8} CFU/ml. Sebanyak 100 μl dari konsentrasi tersebut disebar di *nutrient agar* (NA). Kertas cakram direndam pada larutan film beberapa saat. Kemudian cakram diletakkan pada NA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Setiap larutan film dilakukan tiga kali pengulangan. Selanjutnya dihitung diameter zona hambat kertas cakram.

Uji Biodegradasi

Film $3 \times 3 \text{ cm}$ dikubur pada tanah dengan kedalaman 4 cm. Film dikeluarkan dari dalam tanah setelah 21 hari atau tiga minggu. Karakter film yang diamati adalah kondisi fisik film dan bentuk film setelah didiamkan dalam tanah. Alat uji biodegradasi terdiri dari kotak kaca yang diisi dengan tanah dan air untuk mengatur suhu dan kelembaban pada tanah. Bentuk alat terlihat pada Gambar 1 berikut.

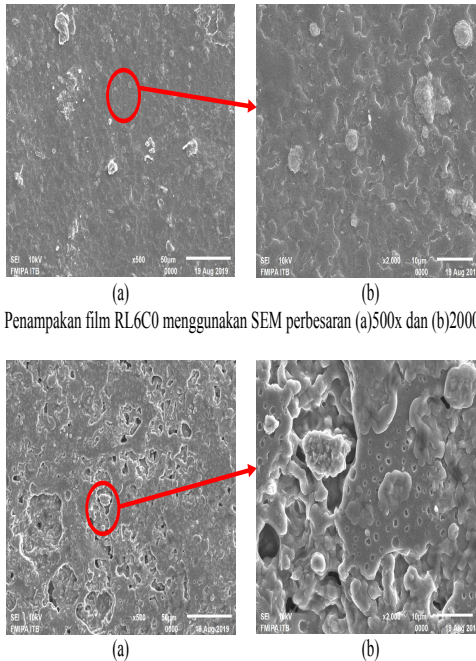


Gambar 1. Uji Biodegradasi

Hasil

Morfologi permukaan film

Hasil pengujian morfologi film menggunakan SEM dapat dilihat pada Gambar 2. Film tanpa minyak serai memiliki permukaan yang lebih homogen dibandingkan film dengan minyak serai. Permukaan film tanpa minyak serai menampilkan permukaan yang tidak berpori dan terdapat gumpalan-gumpalan kecil diatas permukaannya. Film dengan minyak serai memiliki permukaan yang berpori. Pori tersebut disebabkan oleh minyak serai yang belum terlarut sepenuhnya pada larutan film.



Penampakan film RL6C0 menggunakan SEM perbesaran (a)500x dan (b)2000x

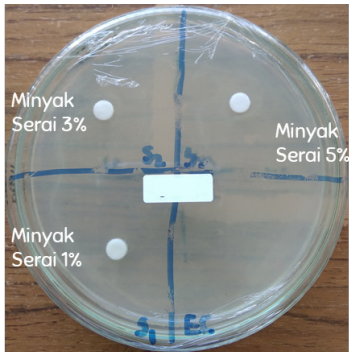
Penampakan film RL6C3 menggunakan SEM perbesaran (a)500x dan (b)2000x

Gambar 2. Penampakan film tanpa minyak serai dan film dengan minyak serai

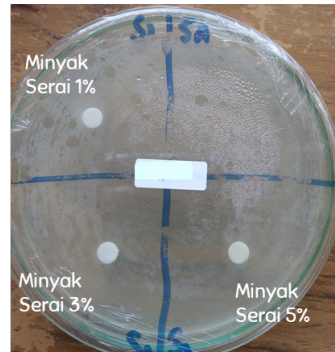
Uji Antimikroba

Parameter pengujian antimikroba dilakukan dengan pendekatan Kirbi-Bauer atau *disk diffusion* untuk didapatkan zona hambatnya. Hasil uji aktivitas antimikroba film dapat dilihat pada Gambar 3. Hasil menunjukkan tidak ada zona hambat yang terbentuk disekitar kertas cakram baik pada bakteri *E.coli* dan *S.aureus*.

Eschericia coli




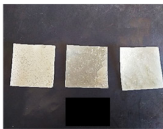
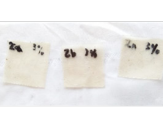





Staphilococcus aureus



Gambar 3. Uji antimikroba

Uji Biodegradasi

Hasil pengujian biodegradasi film dapat dilihat pada Gambar 4. Film dengan atau tanpa minyak serai terdegradasi selama penguburan pada tanah. Permukaan film tertutup dengan tanah dan terjadi perubahan ukuran juga pada film. Kondisi tanah yang lembab dan sifat film yang hidrofilik menyebabkan tanah mudah melekat pada film.

Keterangan	Film Kontrol (0%)	Film 1% Minyak Serai	Film 3% Minyak Serai	Film 5% Minyak Serai
Sebelum pengujian (0 minggu)				
Sesudah pengujian (3 minggu)				

Gambar 4. Uji biodegradasi film



Pembahasan

Film tanpa minyak serai dan film dengan minyak serai memiliki karakteristik permukaan yang berbeda setelah dilakukan pembesaran permukaan menggunakan SEM. Film tanpa minyak serai memiliki permukaan yang lebih homogen dibandingkan film dengan minyak serai. Film dengan matriks homogen merupakan salah satu indikator struktur yang penting sehingga menghasilkan sifat mekanis yang baik (Siah *et al.*, 2015). Film tanpa minyak serai memiliki interaksi antara PVA dan sorbitol yang membentuk permukaan homogen dan tidak memiliki pori (Tian *et al.*, 2017). Penambahan minyak serai menyebabkan larutan film kehilangan sifat homogen larutan sehingga membentuk pori pada film yang terbentuk (Cofelice *et al.*, 2019) dan ini terjadi pada film dengan minyak serai. Penambahan minyak serai diduga menjadi faktor film memiliki celah karena minyak serai menghilangkan sifat homogen dari matriks film. Minyak serai akan bermigrasi ke permukaan kemudian berevaporasi bersama dengan air sehingga membuat permukaan menjadi berpori atau memiliki celah. Itu juga yang menyebabkan minyak serai tidak terlihat pada film ketika dilakukan proses pengambilan gambar. Film dengan minyak esensial yang sedikit akan memberikan permukaan yang lebih halus dibandingkan film dengan minyak atsiri yang banyak (Acevedo-Fani *et al.*, 2015).

Minyak serai banyak mengandung senyawa citral dan citronellal. Citral merupakan komponen senyawa utama pada minyak serai. Saddiq dan Khayyat (2010) menuliskan zona hambat senyawa citral pada *S. aureus* sebesar 3,5mm. Shi *et al.*, (2016) menyebutkan citral memiliki aktivitas antimikroba melawan *C. sakazakii* dengan cara mengubah konsentrasi ATP pada sel, hiperpolarisasi membran sel, dan penurunan pH pada sitoplasma.

Film dengan atau tanpa minyak serai terdegradasi selama penguburan pada tanah. Wang *et al.*, (2015) menyebutkan bahwa polisakarida pada film akan tetap terdegradasi dengan atau tanpa adanya antimikroba. Jika diperhatikan, film dengan minyak serai memiliki ukuran fisik yang lebih kecil dibandingkan film tanpa minyak serai setelah penanaman selama 3 minggu didalam tanah.

Permukaan film yang berpori menjadi salah satu penyebab film dengan minyak serai terdegradasi lebih cepat dibandingkan film tanpa minyak serai. Difusi air dari tanah ke film menyebabkan film menjadi melebar. Sorbitol dan PVA yang terdapat pada film merupakan senyawa hidrofilik yang mudah larut dalam air (Tian *et al.*, 2017). Substrat, oksigen, dan mikroorganisme pada tanah juga membantu proses dekomposisi film (Sen dan Das, 2018).

Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini dilihat dari karakteristik film yang terbentuk, pengaruh konsentrasi minyak serai pada film. Film dengan minyak serai memiliki pori pada permukaannya sedangkan film tanpa minyak serai memiliki permukaan yang halus. Tidak terbentuk zona hambat pada bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Film tanpa/dengan minyak serai terdegradasi setelah tiga minggu didiamkan dalam tanah.

Referensi

- Abdul Khalil, H. P. S., Tye, Y. Y., Saurabh, C. K., Leh, C. P., Lai, T. K., Chong, E. W. N., ... & Syakir, M. I. (2017). Biodegradable polymer films from seaweed polysaccharides: A review on cellulose as a reinforcement material. *Express Polymer Letters*, 11(4).
- Acevedo-Fani, A., Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., & Martín-Belloso, O. (2015). Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. *Food Hydrocolloids*, 47, 168-177.
- Cofelice, M., Cuomo, F., & Chiralt, A. (2019). Alginate Films Encapsulating Lemongrass Essential Oil as Affected by Spray Calcium Application. *Colloids and Interfaces*, 3(3), 58.
- Gumilar, J., Yohana, G. H. R., & Hidayatulloh, A. (2017). Kemampuan Serbuk Serai (*Cymbopogon Citratus*) Menekan Peningkatan Total Bakteri Dan Keasaman (Ph) Dendeng Domba Selama Penyimpanan. *Jurnal Ilmu Ternak*, 17(2), 106-111.



- Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., & Hosseini, S. M. H. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, 122(1), 161-166.
- Saddiq, A.A., & Khayyat, S.A. (2010). Chemical and antimicrobial studies of monoterpene : Citral. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 98, 89-93.
- Sen, C., & Das, M. (2018). Biodegradability of starch based self-supporting antimicrobial film and its effect on soil quality. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(12), 4331-4337.
- Shi, C., Song, K., Zhang, X., Sun, Y., Sui, Y., Chen, Y., ... & Xia, X. (2016). Antimicrobial activity and possible mechanism of action of citral against *Cronobacter sakazakii*. *PLoS One*, 11(7), e0159006.
- Skaria, B. P., Joy, P. P., Mathew, S., & Mathew, G. (2006). Lemongrass. In *Handbook of herbs and spices* (pp. 400-419). Woodhead Publishing.
- Sung, S. Y., Sin, L. T., Tee, T. T., Bee, S. T., Rahmat, A. R., Rahman, W. A. W. A., ... & Vikhrman, M. (2013). Antimicrobial agents for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 33(2), 110-123.
- Tian, H., Liu, D., Yao, Y., Ma, S., Zhang, X., & Xiang, A. (2017). Effect of sorbitol plasticizer on the structure and properties of melt processed polyvinyl alcohol films. *Journal of food science*, 82(12), 2926-2932.
- Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of food science*, 79(7), R1231-R1249.
- Vardhanabhuti, B., & Ikeda, S. (2006). Isolation and characterization of hydrocolloids from monoi (*Cissampelos pareira*) leaves. *Food hydrocolloids*, 20(6), 885-891.
- Wang, H., Wei, D., Zheng, A., & Xiao, H. (2015). Soil burial biodegradation of antimicrobial biodegradable PBAT films. *Polymer degradation and stability*, 116, 14-22.

Aktivitas Antimikroba dari Bakteri Endofit Tanaman Obat *Curcuma zedoaria* Rosc.

Rumella Simarmata¹, Nuriyanah¹ and Liseu Nurjanah¹

¹Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia,
Cibinong, Indonesia

Abstrak. Kunyit putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.) dikenal sebagai obat herbal. Kunyit putih mengandung senyawa curcumin, flavonoid, dan saponin yang memiliki manfaat sebagai antibakteri. Potensi bakteri endofit yang diisolasi dari kunyit putih perlu dipelajari. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas bakteri endofit kunyit putih dalam menghambat pertumbuhan mikroba patogen. Kunyit putih diperoleh dari Bogor, Jawa Barat, Indonesia. Aktivitas antimikroba dari bakteri endofit terpilih diseleksi terhadap lima mikroba patogen *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, dan *Candida albicans* yang mempunyai prevalensi paling dominan menginfeksi manusia dengan tingkat infeksi yang tinggi. Penentuan aktivitas antibakteri dan anti-yeast dilakukan dengan metode difusi cakram kertas. Supernatan kultur dari masing-masing isolat endofit ditetaskan pada medium agar yang ditumbuhkan mikroba patogen. Berdasarkan uji antimikroba, 6 isolat dari 21 isolat terpilih menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap setidaknya satu dari organisme uji. Isolat KPD 3 menunjukkan aktivitas antimikroba yang tinggi terhadap *C. albicans* dan *B. subtilis*, masing-masing dengan indeks penghambatan 3,56 dan 1. Isolat KPD 6, KPR 8, dan isolat KPR 9 menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap *C. albicans*, dengan indeks penghambatan 2,33; 1,55; 1,7 berturut-turut. Sementara itu, isolat KPU 1 dan KPU 2 menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap *B. subtilis*, dengan indeks penghambatan masing-masing 2,91 dan 7,5. Isolat KPD 3 menunjukkan aktivitas antimikroba tertinggi. Hasil menunjukkan adanya potensi besar dari strain ini untuk dikembangkan di industri farmasi. Berdasarkan hasil identifikasi molekuler, isolat bakteri endofit yang berpotensi menghasilkan senyawa antimikroba pada penelitian ini yaitu KPU 1, KPU 2, KPD 2, dan KPD 6 berturut-turut teridentifikasi sebagai *Pseudomonas otitidis*, *Bacillus paramycooides*, *Bacillus safensis*, dan *Bacillus nakamurai*.

Keywords: antimikroba, antiyeast, *Curcuma zedoaria* Rosc., bakteri endofit



Pendahuluan

Penyakit infeksi masih menjadi masalah kesehatan utama di negara berkembang, termasuk Indonesia. Penyakit tersebut dapat disebabkan oleh mikroba patogen, seperti bakteri, jamur, atau parasit. Penyakit infeksi akan menyebabkan kematian jika tidak ditangani secara serius. Pengobatan penyakit infeksi umumnya menggunakan antimikroba yang disebut antibiotik. Penggunaan antibiotik yang tidak tepat dapat menyebabkan resistensi mikroba patogen. Penelitian-penelitian baru diperlukan untuk mengatasi masalah resistensi antibiotik, salah satunya dengan pengembangan obat antimikroba baru dari tanaman obat yang diduga memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Indonesia memiliki bermacam jenis tanaman rempah dan obat. Tanaman obat yang sering digunakan sebagai obat herbal salah satunya adalah tanaman dari famili Zingiberaceae.

Zingiberaceae merupakan famili penting dari kelompok tanaman obat dan aromatik. Banyak senyawa aktif telah terdeteksi dalam spesies Zingiberaceae, diantaranya flavonoid, turmerin, seskuiterpen, steroid dan minyak atsiri (Joy *et al.*, 1998). *Curcuma zedoaria* yang dikenal sebagai kunyit putih paling menarik untuk dikaji keragaman dan manfaat mikroba endofitnya dikarenakan secara tradisional tanaman ini dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai obat herbal untuk mengobati berbagai penyakit.

Beberapa studi ilmiah menunjukkan bahwa rimpang kunyit putih memiliki efek farmakologis, diantaranya antikanker (Muthu-Kumar *et al.*, 2012), antibakteri (Banisalam *et al.*, 2011), antifungi (Shinobu-Mesquita *et al.*, 2011), antioksidan (Dhal *et al.*, 2012), dan antitirosin (Narayanaswamy *et al.*, 2011). Kandungan kimia yang dominan dari rimpang *C. zedoaria*, antara lain: kurkuminoid (diarilheptanoid), minyak atsiri, polisakarida serta golongan lain. Kandungan tersebut diketahui mempunyai aktivitas sebagai antibakteri (Windono *et al.*, 2002).

Beberapa penelitian melaporkan aktivitas farmakologik dari ekstrak rimpang *C. zedoaria* sebagai antimikroba. Yusuf (2001), melaporkan bahwa ekstrak etanol rimpang kunyit putih mampu menghambat pertumbuhan *Micrococcus luteus*, *Enterococci faecalis*,

Staphylococcus aureus, tetapi tidak menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*. Bugno (2007) melaporkan, ekstrak kunyit putih mampu menghambat *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. Sementara itu, Shinobu-Mesquita (2011) melaporkan ekstrak hidroalkoholik dari *C. zedoaria* mampu menghambat yeast *C. albicans*. Meskipun hasil penelitian mengenai aktivitas antimikroba dari ekstrak tanaman kunyit putih telah banyak dilaporkan, namun hasil penelitian mengenai aktivitas antimikroba dari bakteri endofit yang berasosiasi dengan tanaman *C. zedoaria* masih sangat sedikit. Karena itu penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antimikroba dari bakteri endofit tanaman kunyit putih.

Endofit merupakan mikroba yang hidup dan mengkolonisasi bagian dalam jaringan tanaman (daun, batang, akar, buah) dan dapat tinggal selama seluruh atau sebagian dari siklus hidupnya tanpa menyebabkan kerusakan atau penyakit bagi inangnya. Ratusan spesies mikroba endofit dapat diisolasi dari satu jenis tanaman, dan sedikitnya satu spesies dapat menunjukkan karakteristik dari tanaman inangnya (Tan dan Zou, 2001).

Penelitian yang mempelajari potensi mikroba endofit dalam menghasilkan senyawa bioaktif telah dilakukan. Senyawa bioaktif yang dihasilkan diantaranya senyawa antikanker, antimikroba, antioksidan, antiinflamasi, dan senyawa kimia lainnya yang bermanfaat dalam bidang kesehatan (Tan dan Zou 2001; Strobel dan Daisy 2003). *Pseudomonas*, *Bacillus* dan *Burkholderia* adalah genus bakteri endofit yang paling sering terisolasi dan berpotensi sebagai penghasil senyawa bioaktif. Beberapa penelitian mengenai mikroba endofit yang diisolasi dari rimpang *C. zedoaria* menunjukkan adanya aktivitas antimikroba yang dihasilkan endofit tersebut (Srikandace *et al.*, 2007). Senyawa bioaktif yang terkandung dalam kunyit putih diduga erat kaitannya dengan keberadaan mikroba endofit dalam tanaman tersebut. Keberagaman mikroba endofit dari tanaman kunyit putih sangat memungkinkan untuk ditemukannya berbagai macam senyawa kimia baru yang berpotensi besar sebagai bahan baku obat.



Pemanfaatan mikroba endofit asal tanaman obat untuk menghasilkan obat baru perlu dilakukan untuk memperoleh dan mengembangkan senyawa bioaktif baru tanpa menggunakan tanaman obatnya sehingga kelestarian tanaman obat tetap terjaga. Keragaman bakteri endofit yang tinggi dapat memberikan peluang untuk ditemukannya spesies langka dan spesies baru yang mampu menghasilkan senyawa aktif untuk kandidat obat baru. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas bakteri endofit yang diisolasi dari tanaman kunyit putih asal Bogor, Jawa Barat, dalam menghambat pertumbuhan mikroba patogen. Diharapkan keragaman bakteri endofit dari kunyit putih asal Bogor mampu menghasilkan senyawa antimikroba yang baru sebagai kandidat obat baru.

Metode

Isolasi Bakteri Endofit

Bakteri endofit dari tanaman kunyit putih diisolasi menggunakan metode potongan tanaman (Tomita, 2003). Sampel tanaman dicuci dengan air mengalir selama 10 menit kemudian dipotong menjadi beberapa bagian dengan panjang 2-3 cm. Bagian tanaman dipisahkan antara rimpang, umbi dan daun. Masing-masing bagian tanaman disterilisasi permukaan dengan cara direndam dalam larutan alkohol 70% selama 1 menit. Potongan tanaman kemudian direndam dalam larutan sodium hipoklorit 5,3% selama 5 menit dan alkohol selama 0,5 menit. Sampel kemudian dikeringkan menggunakan kertas tisu steril. Potongan sampel dibelah dengan pisau steril dan diletakkan di atas permukaan media dalam cawan petri. Cawan petri diinkubasi pada suhu 28 °C selama 2 – 15 hari. Media yang digunakan adalah *Nutrient Agar* (NA) yang ditambah Nystatin 100 mg/L untuk menghambat pertumbuhan kapang.

Pengujian antimikroba

Isolat mikroba endofit diuji aktivitas mikrobanya dengan metode difusi cakram kertas. Bakteri endofit ditumbuhkan pada erlenmeyer berisi medium potato dextrose broth (PDB) sebanyak

200 ml dan diinkubasi pada shaking inkubator dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam di suhu ruang. Setelah itu, kultur dipanen dengan sentrifugasi 5000 rpm selama 5 menit dan supernatan dipisahkan dari pellet. Masing-masing supernatan kemudian digunakan untuk uji aktivitas antimikroba.

Mikroba Patogen uji

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Candida albicans* diperoleh dari Puslit Bioteknologi, LIPI dan digunakan sebagai mikroba patogen uji. Seluruh bakteri uji ditumbuhkan pada media padat Nutrient Agar (NA) sedangkan yeast *C. albicans* ditumbuhkan pada media padat Potato Dextrose Agar (PDA). Satu ose dari masing-masing mikroba patogen kemudian ditumbuhkan pada tabung berisi 3 ml medium nutrient broth (NB) untuk bakteri dan PDB untuk yeast. Kultur inkubasi pada shaking incubator dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam pada suhu ruang. Kultur kemudian digunakan untuk uji aktivitas antimikroba.

Bioassay

Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan secara in vitro menggunakan metode difusi agar cakram kertas. Sebanyak 50 µl suspensi dari masing-masing mikroba patogen (1×10^5 sel/ml) diinokulasi pada 200 ml medium NA untuk bakteri patogen dan PDA untuk yeast dalam kondisi cair pada suhu $\pm 40^\circ\text{C}$, kemudian medium dituang pada petridish. Setelah medium memadat, paper disk diletakkan pada permukaan media dan ditetaskan masing-masing supernatan dari isolat bakteri endofit sebanyak 20 µl setelah itu diinkubasi selama 1-2 hari pada suhu 37°C . Zona bening di sekitar paper disk yang diinokulasi supernatan diamati dan dihitung indeks penghambatannya. Indeks penghambatan dihitung berdasarkan persamaan sebagai berikut:

$$\frac{\text{diameter zona hambat}}{\text{diameter koloni (paper disk)}} = \text{indeks penghambatan}$$



Sebagai kontrol negatif digunakan media NB dan PDB, sedangkan kontrol positif menggunakan antibiotik kloramfenikol untuk bakteri patogen *S. aureus* dan *B. subtilis*, ampisilin untuk *E.coli*, dan *P. aeruginosa* serta nystatin untuk yeast *C. albicans*.

Identifikasi Molekuler Bakteri Endofit

Identifikasi molekuler dilakukan pada isolat bakteri yang mempunyai indeks penghambatan. Isolat bakteri tersebut dideterminasi dengan menggunakan analisis sekuen gen 16S-rRNA. Gen 16S-rRNA dianalisis secara lengkap di 1st BASE Malaysia. Analisis hasil sekuens dilakukan dengan program BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) dari NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Hasil dan Pembahasan

Bakteri endofit yang diperoleh pada penelitian sebelumnya sejumlah 21 isolat. Isolat yang diperoleh mempunyai keragaman molekuler yang tinggi dan aktivitas antimikroba yang beragam. Berikut adalah hasil pengujian antimikroba patogen manusia dari keseluruhan isolat bakteri yang diuji (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil pengujian aktivitas antimikroba isolat bakteri endofit asal kunyit putih

No	Kode Isolat	Indeks penghambatan ^{*)} terhadap				
		Sa	Ec	Bs	Pa	Ca
1	KPR 1	-	-	-	-	-
2	KPR 2	-	-	-	-	-
3	KPR 3	-	-	-	-	-
4	KPR 4.1	-	-	-	-	-
5	KPR 4.2	-	-	-	-	-
6	KPR 5	1,71	-	-	-	-
7	KPR 6	1,33	-	-	-	-
8	KPR 7	-	-	-	-	-
9	KPR 8	-	-	-	-	1,55
10	KPR 9	-	-	-	-	1,70
11	KPU 1	1,1	19	2,91	-	-
12	KPU 2	-	-	7,5	-	-
13	KPU 4	-	-	-	-	-
14	KPU 5	-	-	-	-	-
15	KPD 1.1	-	-	-	-	-
16	KPD 1.2	1,25	-	-	-	-
17	KPD 2	4,33	-	-	-	-
18	KPD 3	2	-	1,00	-	3,56
19	KPD 4	-	-	-	-	-
20	KPD 5	-	-	-	-	-
21	KPD 6	2	1,75	-	-	4
	K+ (Ampicillin)		2,67		3,33	
	K+ (Kloramfenikol)	5		4,17		
	K+ (Nystatin)					3,33

Keterangan

Sa = *Staphylococcus aureus*
 Ec = *Eschericia coli*
 Bs = *Bacillus subtilis*
 Pa = *Pseudomonas aeruginosa*
 Ca = *Candida albicans*

^{*)}Nilai indeks penghambatan adalah rata-rata nilai dari 3 kali ulangan pengujian antimikroba



Berdasarkan hasil pengujian antimikroba, 10 dari 21 isolat bakteri endofit mempunyai aktivitas antimikroba. Isolat KPD 2 mempunyai aktivitas antimikroba tertinggi terhadap *S. aureus* ($4,33 < 5$ Kloramfenikol), KPU 1 mempunyai aktivitas antimikroba tertinggi terhadap *E. coli* ($19 > 2,67$ Ampisilin), KPU 2 mempunyai aktivitas antimikroba tertinggi terhadap *B. subtilis* ($7,5 > 4,17$ Kloramfenikol), KPD 6 mempunyai aktivitas antimikroba tertinggi terhadap *C. albicans* ($4 > 3,33$ Nystatin). Perbedaan indeks penghambatan dari setiap isolat bakteri endofit disebabkan karena adanya perbedaan kandungan senyawa aktif antimikroba yang dihasilkan masing-masing isolat. Kondisi lingkungan tempat tumbuh tanaman inang berpengaruh terhadap populasi dan profil mikroba endofit. Tanaman inang yang tumbuh di lingkungan tropis mempunyai keragaman mikroba endofit yang tinggi dan setiap tanaman mempunyai mikroba endofit dengan berbagai keragaman genetik. Dapat disimpulkan bahwa keragaman mikroba endofit dari suatu tanaman tergantung pada jenis tanaman inang dan tempat tumbuhnya.

Tiga menunjukkan aktivitas antimikroba yang lebih tinggi dibandingkan kontrol positif antibiotik dan 1 isolat bakteri menunjukkan aktivitas antimikroba yang hampir sama dengan kontrol positif (antibiotik komersil). Isolat tersebut adalah KPD 2, KPU 1, KPU 2, dan KPD 6 yang berpotensi menghasilkan senyawa antimikroba sebagai sumber bahan obat antimikroba baru.

Mekanisme kerja senyawa antibakteri mikroba endofit kunyit putih diduga dengan cara menghambat pembentukan lapisan dinding sel secara utuh yaitu peptidoglikan dan akhirnya akan mengakibatkan kematian sel. Isolat bakteri yang mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan beberapa bakteri patogen seperti isolat KPU 1 dikategorikan bakteri yang mempunyai efektifitas antibakteri yang tinggi. Senyawa antibakteri yang dihasilkan dapat bereaksi dan mempunyai beberapa target sasaran pada membran bakteri, sehingga menyebabkan kerusakan atau autolisis dan kematian sel bakteri target (Ahn *et al.*, 2003).

Seperti yang dijelaskan sebelumnya bahwa mikroba endofit yang diisolasi dari tanaman kunyit putih dapat menghasilkan

senyawa antimikroba seperti yang dihasilkan oleh tanaman kunyit putih sebagai inangnya. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa bakteri endofit yang berhasil diisolasi dari tanaman kunyit putih juga mempunyai aktivitas antimikroba. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Muharmi *et al.*, (2016), yang melaporkan bahwa jamur endofitik *Aspergillus* sp. dari daun tanaman kunyit putih mempunyai aktivitas antimikroba terhadap *E. coli*, *S. dysenteriae*, *S. aureus*, dan *B. subtilis*. Senyawa yang dihasilkan adalah metil 6-(5'-(2"-asetoksi-2"-metilpropanoil)-3"-metil-2'-(3"-metilbutanoil)fenil)-3- metilbutanoat. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui senyawa aktif yang dihasilkan oleh bakteri endofit asal kunyit putih yang berpotensi sebagai antimikroba pada penelitian ini.

Berdasarkan hasil pengamatan uji daya hambat pada hari pertama setelah diinkubasi selama 24 jam hingga hari ke 5, zona bening di sekitar paperdisk yang diinokulasi supernatan dari isolat bakteri endofit menunjukkan indeks penghambatan yang tetap bahkan cenderung sedikit meningkat pada seluruh bakteri patogen uji. Hal tersebut berarti bahwa senyawa antimikroba yang dihasilkan bakteri endofit bersifat bakterisida. Menurut Mycek (2001), suatu antimikroba bersifat bakteriosida jika diameter zona hambatan tetap atau meningkat, hal ini disebabkan karena senyawa yang dihasilkan mampu membunuh dan menghentikan aktivitas fisiologis dari bakteri, meskipun pemberian senyawa tersebut dihentikan. Sementara itu, antimikroba bersifat bakteriostatik jika senyawa antimikroba tersebut hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri jika pemberian senyawa terus dilakukan dan jika dihentikan atau habis, maka pertumbuhan dan perbanyakkan dari bakteri akan kembali meningkat yang ditandai dengan berkurangnya diameter zona hambatan.

Kontrol positif untuk isolat bakteri *E.coli*, dan *P. aeruginosa* menggunakan ampisilin. Ampisilin merupakan derivat penisilin dan kelompok antibiotik β -lactam yang memiliki spektrum antimikroba yang luas. Ampisilin efektif terhadap mikroba Gram positif dan Gram negatif. Mekanisme kerja ampisilin adalah menghambat sintesis dinding sel bakteri dengan cara menghambat



pembentukan mukopeptida, Sintesis dinding sel akan terganggu sehingga bakteri tersebut tidak mampu mengatasi perbedaan tekanan osmosis di luar dan di dalam sel dan akhirnya bakteri akan mati. Kontrol positif untuk *S. aureus* dan *B. subtilis* adalah kloramfenikol. Kloramfenikol merupakan antibiotik spektrum luas. Antibiotik ini mampu terikat secara reversibel pada sub unit 50s ribosom dan menghambat sintesis protein pada bakteri sehingga akhirnya bakteri akan mati. Kontrol positif untuk yeast *C. albicans* adalah nystatin. Nystatin bekerja dengan langsung merusak dinding sel *C. albicans* dan merusak membran dengan membentuk pori sehingga komponen intra sel keluar dan sel *C. albicans* akan mengalami kematian (Tjai dan Rahardja, 2007).

Hasil analisis BLAST dari isolat bakteri endofit penghasil antimikroba menunjukkan bahwa isolat KPD 3, KPD 6, KPR 5, KPR 6, KPR 8, KPR 9, KPU 1, KPU 2, KPD 1.2 dan KPD 2 teridentifikasi sebagai *Bacillus safensis*, *Bacillus nakamurai*, *Bacillus aerius*, *Pseudomonas monteilii*, *Burkholderia lata*, *Burkholderia metallica*, *Pseudomonas otitidis*, *Bacillus paramycoides*, *Bacillus aryabhatai*, dan *Bacillus safensis* berdasarkan urutan gen 16S rRNA dengan persen similaritas di atas 97%. Berdasarkan hasil identifikasi molekuler, isolat bakteri endofit yang berpotensi menghasilkan senyawa antimikroba pada penelitian ini berasal dari genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, dan *Burkholderia*. Genus tersebut adalah genus yang paling dominan dan banyak menghasilkan senyawa bioaktif (Ryan *et al.*, 2007).

Bacillus safensis sebelumnya telah dilaporkan menghasilkan senyawa antimikroba yang dapat menghambat bakteri patogen MDR (multi drug resistant) seperti *S.aureus* dan *P.aeruginosa* (Iqbal *et al.*, 2018). Sementara itu, *B. aerius* B81e juga dilaporkan mempunyai aktivitas penghambatan terhadap *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* (Meidong *et al.*, 2018). Sen *et al.*, (2019), melaporkan bahwa *Bacillus paramycoides* dapat menghasilkan senyawa antimikroba dengan menghambat pembentukan biofilm. Namun belum ditemukan laporan yang menyebutkan bahwa *Bacillus nakamurai*, *Bacillus aryabhatai*, *Burkholderia lata*, *Pseudomonas otitidis*, dan *Pseudomonas monteilii* yang menghasilkan senyawa antimikroba.

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa, isolat KPD 2, KPU 1, KPU 2, dan KPD 6 berpotensi menghasilkan senyawa antimikroba sebagai sumber bahan obat antimikroba baru. Keragaman isolat mikroba isolasi tanaman kunyit putih asal Kebun Raya Bogor mempunyai potensi sumber senyawa aktif baru sebagai bahan baku obat

Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada kemeristek dikti dan LIPI yang membantu pendanaan penelitian melalui kegiatan INSINAS 2019. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Tiwit Widowati dan Sylvia J.R.L yang membantu pelaksanaan penelitian ini.

Referensi

- Ahn, D. K., Han, T. W., Shin, H. W., Jin, I. N., & Kim, S. Y. (2003). Diversity and antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- Banisalam, B., Sani, W., Philip, K., Imdadul, H., & Khorasani, A. (2011). Comparison between in vitro and in vivo antibacterial activity of *Curcuma zedoaria* from Malaysia. *African Journal of Biotechnology*, 10(55), 11676-11681.
- Bugno A, Nicoletti MA, Almodóvar AAB. (2007). Antimicrobial efficacy of *Curcuma zedoaria* extract as assessed by linear regression compared with commercial mouthrinses. *Braz J Microbiol* 38:440-445.
- Chen, Y. T., Yuan, Q., Shan, L. T., Lin, M. A., Cheng, D. Q., & Li, C. Y. (2013). Antitumor activity of bacterial exopolysaccharides from the endophyte *Bacillus amyloliquefaciens* sp. isolated from *Ophiopogon japonicus*. *Oncology letters*, 5(6), 1787-1792.
- Dhal, Yogayama; Deo, Bandita; Sahu, R. K. (2012). Antioxidant activity of enzymatic extracts of *Curcuma zedoaria* (Christm.). *Int. J. Pharm. Pharmaceut. Sci*, 4: 343-346.



- Gupta, Banerjee, Achari. (1976). Isolation of ethyl-p-methoxycinnamate, the major antifungal principle of *Curcuma zedoaria*. *Lloydia* 39 (4): 218-22.
- Harrison L, Teplow C, Rinaldi M, Strobel GA. (1991). Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae*, possessing broad spectrum antifungal activity. *J Gen Microbiol*. 137:2857–2865.
- Iqbal, S., Qasim, M., Rahman, H., & Sajid, I. (2018). Screening, Characterization and Optimization of antibacterial peptides, produced by *Bacillus safensis* strain MK-12 isolated from waste dump soil KP, Pakistan. *bioRxiv*, 308205.
- Jalgaonwala RE, Mahajan RT. (2011). A Review: Bacterial endophytes and their bioprospecting. *J Phar Res*. 4:795–799.
- Joy, P. P., Thomas J., Mathew, S., dan Skaria, B. B. (1998). *Zingiberaceae Medicinal and Aromatic Plants*. Aromatic and Medicinal Plants Research Station, Odakkali, Asamannoor P.Q., Kerala. India.
- Mano H, Morisaki H. (2008). Minireview: Endophytic bacteria in rice plant. *Microb Environ*. 23:109–117.
- Meidong, R., Khotchanalekha, K., Doolgindachbaporn, S., Nagasawa, T., Nakao, M., Sakai, K., & Tongpim, S. (2018). Evaluation of probiotic *Bacillus aerius* B81e isolated from healthy hybrid catfish on growth, disease resistance and innate immunity of Pla-mong *Pangasius bocourti*. *Fish & shellfish immunology*, 73, 1-10.
- Muharni, M., Fitrya, F., Purwaningrum, W., & Nugraha, A. Y. (2016). Secondary Metabolite from Endophytic Fungi *Aspergillus* Sp. The Leave of Kunyit Putih (*Curcuma zedoaria* (Berg) Roscoe). *Molekul*, 11(1), 125-134.
- Muthu kumar, T., Mary Violet Christy A, Anusha Mangadu2, M. Malaisamy3, C.Sivaraj3, P. Arjun, Raaman, N., & Balasubramanian, K. (2012). Anticancer and antioxidant activity of *Curcuma zedoaria* and *Curcuma amada* rhizome extracts. *J. Acad. Indus. Res*. Vol. 1(2).
- Mycek, M. J., Harvey, R. A., & Champe, C. C. (2001). *Farmakologi Ulasan Bergambar*. Lippincott's Illustrated Reviews:

- Farmacology. *Penerjemah Azwar Agoes. Edisi II. Jakarta: Widya Medika.*
- Narayanaswamy, N., Duraisamy, A., & Balakrishnan, K. P. (2011). Screening of some medicinal plants for their antityrosinase and antioxidant activities. *Int. J. PharmTech Res*, 3, 1107-1112.
- Ratnaweera, P. B., & de Silva, E. D. (2017). Endophytic fungi: A remarkable source of biologically active secondary metabolites. In *Endophytes: Crop Productivity and Protection* (pp. 191-212). Springer, Cham.
- Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., & Dowling, D. N. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS microbiology letters*, 278(1), 1-9.
- Sen, R., Mukherjee, S., Paul, R., & Narula, R. (Eds.). (2019). *Biotechnology and Biological Sciences: Proceedings of the 3rd International Conference of Biotechnology and Biological Sciences (BIOSPECTRUM 2019), August 8-10, 2019, Kolkata, India.* CRC Press.
- Shinobu-Mesquita, C., Bertoni, T., Guilhermetti, E., Terezinha, I., & Svidzinski, T. (2011). Antifungal activity of the extract of *Curcuma zedoaria* against yeasts of the genus *Candida* isolated from the oral cavity of patients infected with the human immunodeficiency virus. *Rev. Bras. Farmacogn*, 21(1), 128-132.
- Srikandace Y, Hapsari Y, Simanjuntak P. (2007). Seleksi mikroba endofit *Curcuma zedoaria* dalam memproduksi senyawa kimia antimikroba. *JIFI*. 5(2):77-84.
- Strobel G, Daisy B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev*. 67:491-502.
- Syu WJ, Shen CC, Don MJ, Ou JC, Lee GH, Sun CM. (1998). Cytotoxicity of curcuminoids and some novel compounds from *Curcuma zedoaria*. *J Nat Prod* 61 (12): 1531-4.
- Tan, R. X., dan Zou, W. X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural product reports*, 18(4), 448-459.



- Tjay, T. H., & Rahardja, K. (2007). *Obat-obat penting: khasiat, penggunaan dan efek-efek sampingnya*. Elex Media Komputindo.
- Tomita, F. (2003). Endophytes in Southeast Asia and Japan: their taxonomic diversity and potential applications. *Fungal Diversity*, 14, 187-204
- Windono, M.S. dan Parfiani, N. (2002), *Curcuma zedoria* Rosc., Kajian pustaka kandungan kimia dan aktivitas farmakologik, *Artocarpus*, 2(1):1-10).
- Yuliati, Y. (2017). Uji efektivitas ekstrak kunyit sebagai antibakteri dalam pertumbuhan *Bacillus* sp dan *Shigella dysenteriae* secara in vitro. *Jurnal Profesi Medika: Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*, 10(1).
- Yusuf NA, Ibrahim H, Khalid N. (2001). Antibacterial evaluation and tissue culture studies of selected medicinal *Curcuma* species. Proc. NSF Workshop 2001, Kuala lumpur.

Isolasi Open Reading Frame (Orf) 6-Fosfo- β -Glukosidase dari *Bacillus* sp. T3 dan Karakterisasinya dengan Pendekatan *In Silico*

Sih Pirenangingtyas¹, Muhammad Saifur Rohman^{1*},
Jaka Widada¹

¹Laboratorium Mikrobiologi Pertanian, Departemen Mikrobiologi
Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

*Korespondensi: saifur@ugm.ac.id

Abstrak. 6-fosfo- β -glukosidase merupakan enzim yang dapat merombak selubiosa dan menghasilkan glukosa. Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi *Open reading frame* (ORF) 6-fosfo- β -glukosidase dan melakukan karakterisasi melalui pendekatan *in silico*. ORF 6-Fosfo- β -glukosidase diisolasi dari genom *Bacillus* sp. T3 dan disekuensing. Hasil sekuensing dianalisis dengan BLASTx. Karakterisasi secara *in silico* dilakukan dengan ExPASy ProtParam, MEGA7, Swiss Model, dan PyMOL 2.2. ORF 6-fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 memiliki ukuran nukleotida sebesar 1395 bp. Analisis BLASTx menunjukkan bahwa 6-fosfo- β -glukosidase memiliki identitas sebesar 94% dengan 6-fosfo- β -glukosidase dari grup *Bacillus*. Analisis fisikokimia dari produk ORF menunjukkan bahwa 6-fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 memiliki rasio asam amino basa dan asam, rasio Arg/Lys, dan rasio Ala/Gly masing-masing sebesar 0,89; 0,606; dan 0,55. Analisis struktural menunjukkan bahwa 6-fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 masuk ke dalam famili GH1 dengan bentuk topologi α/β TIM barrel. Dua residu katalitik dari 6-fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3, Glu-157 dan Glu-365, memiliki orientasi yang sama terhadap residu-residu yang sesuai dari 6-fosfo- β -galaktobiosidase *Geobacillus stearothermophilus* (4ZE5). Analisis struktural menunjukkan bahwa 6-fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 memiliki dua residu pengikatan fosfat, Lys-425 dan Tyr-427. Berdasarkan analisis tersebut, 6-fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 memiliki karakteristik yang mengarah pada karakteristik kelompok bakteri termofil. Hasil tersebut memerlukan uji eksperimental untuk mendukung analisis *in silico* dari 6-fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3.

Kata kunci : ORF, 6-Fosfo- β -glukosidase, *Bacillus* sp. T3, isolasi, *in silico*.



Pendahuluan

Selulosa merupakan salah satu senyawa organik yang melimpah di bumi. Senyawa ini juga berperan sebagai penyusun utama dalam struktur lignoselulosa yang dapat digunakan sebagai alternatif sumber energi. Selulosa merupakan polisakarida linier dengan ikatan β -1,4-glikosidik (Gupta *et al.*, 2012). Selulosa bersifat rekalsitran terhadap degradasi enzimatik karena kristalinitasnya (Koeck *et al.*, 2014). Hidrolisis enzimatik selulosa menjadi monosakarida seperti glukosa melibatkan aksi sinergis dari setidaknya tiga enzim yang berbeda : endoglukanase, eksoglukanase atau ekso-selobiohidrolase, dan β -glukosidase atau selubiasa (Li *et al.*, 2013). Sebagian selulosa tidak terdegradasi secara sempurna menjadi monosakarida sederhana, melainkan terhenti pada selubiosa. Hal tersebut dikarenakan aktivitas endoglukanase dan eksoglukanase dihambat oleh keberadaan selubiosa (Ahmed *et al.*, 2017).

β -glukosidase merupakan salah satu enzim yang memegang peran penting dalam degradasi selulosa secara sempurna. β -glukosidase menyelesaikan tahap akhir hidrolisis dengan mengubah selubiosa (produk antara hidrolisis selulosa) menjadi glukosa (Li *et al.*, 2013). Sama halnya dengan β -glukosidase, 6-fosfo- β -glukosidase (EC. 3.2.1.86) berperan dalam degradasi selubiosa. 6-fosfo- β -glukosidase menghidrolisis ikatan β -1,4 glikosidik dari selubiosa-6-fosfat dan menghasilkan glukosa dan glukosa-6-fosfat sebagai produk akhirnya (Yu *et al.*, 2013). β -glukosidase dan turunannya adalah enzim dengan distribusi yang luas pada bakteri, jamur, tanaman, dan hewan. Telah banyak penelitian mengenai enzim 6-fosfo- β -glukosidase. Genus *Bacillus* merupakan salah satu genus bakteri mesofil yang dapat memproduksi 6-fosfo- β -glukosidase. Zhang dan Aronson (1994) mengisolasi gen penyandi 6-fosfo- β -glukosidase yang berasal dari *Bacillus subtilis*. Selain itu, Tobisch *et al.*, (1997) mendapatkan sistem β -glukosidase dari *Bacillus subtilis* yang tersusun atas lima gen pengkode yaitu sistem *phosphotransferase* (PTS), enzim II (*licB* dan *licC*), enzim IIA (*licA*), *putative* 6-fosfo- β -glukosidase (*licH*),

dan protein regulator (*licR*). Sampai saat ini gen penyandi 6-fosfo- β -glukosidase masih terus dikaji lebih mendalam.

Metode Penelitian

Isolat Bakteri

Bacillus sp. T3 diisolasi dari tanah Pegunungan Jayawijaya, Timika, Kabupaten Mimika dengan pH 5,5. *Bacillus* sp. T3 ditumbuhkan ke dalam medium *Nutrient agar* selama 24 jam pada suhu 37°C. Untuk mengetahui aktivitas selulolitik, isolat bakteri diinokulasi menggunakan metode titik pada minimal medium agar yang mengandung 1% *Caboxymethyl Cellulose (Caboxymethyl Cellulose Sodium Salt C5013, Merck)* dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Setelah itu, dilakukan pengujian aktivitas selulolitik dengan menggunakan Congo Red (Congo Red C6277, Merck) 0,3%. Isolat bakteri ditetesi dengan congo red 0,3% hingga merata. Setelah itu, didiamkan selama 30 menit dan ditambahkan 1M NaCl (NaCl, Merck). Kemudian diamati dan diukur indeks selulolitiknya.

$$\text{Indeks selulolitik} = \frac{\text{rerata diameter zona bening}}{\text{rerata diameter koloni bakteri}}$$

Isolasi Genom dan Amplifikasi Orf 6-fosfo- β -glukosidase

Bakteri *Bacillus* sp. T3 ditumbuhkan pada Luria Bertani cair dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Sel bakteri dipanen dengan cara disentrifus untuk selanjutnya diisolasi genomnya dengan menggunakan Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Isolasi ORF 6-Fosfo- β -glukosidase dilakukan dengan menggunakan teknik PCR. Amplifikasi tersebut dilakukan dengan menggunakan primer BglC-F (5' ATGTGGGGCTCTGCTTCTGC 3') dan primer BglC-R (5' TTATAAACTTTCTCCGTTTGTCTTGATG 3'). Amplifikasi berlangsung dalam kondisi sebagai berikut : *Pre-denaturation* pada suhu 94°C selama 2 menit; *denaturation* pada suhu 98°C selama 10 detik; *annealing* pada suhu 55°C selama 30 detik; *extention* pada suhu 68°C selama 50 detik; dan *final extention* pada suhu 68°C selama 5 menit (28 siklus). Kemudian, dilakukan elektroforesis



menggunakan gel agarose dengan konsentrasi 1% dan Buffer TBE 0,5X. Hasil elektroforesis direndam ke dalam larutan EtBr dan divisualisasi dengan menggunakan sinar UV.

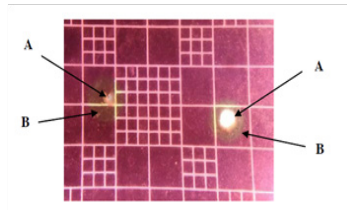
Analisis In Silico

Analisis *in silico* penelitian ini meliputi analisis komposisi asam amino, dan analisis struktur protein. Urutan basa DNA dianalisis menggunakan *DNA Baser sequence assembler v4.36.0* dan *BLASTx*. *CustalW multiple sequence alignment* dan *Mega 7.0* digunakan untuk mengetahui perbandingan urutan asam amino dan analisis filogenetik dari produk ORF 6-Fosfo- β -glukosidase. Analisis karakter fisikokimia protein dilakukan dengan menggunakan program *ExPaSy ProtParam* (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>). Struktur protein 6-Fosfo- β -glukosidase dianalisis dengan menggunakan *The PSIPRED Protein Sequence Analysis Workbench* (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), *SWISS MODEL* (<https://swissmodel.expasy.org/>) dan *PyMOL 2.2*.

Hasil dan pembahasan

Pengujian Aktivitas Selulolitik pada *Bacillus* sp. T3

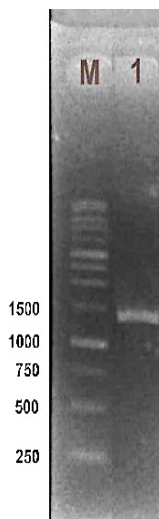
Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui adanya aktivitas selulolitik pada *Bacillus* sp. T3. Hasil pengujian aktivitas selulolitik menunjukkan adanya zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri (Gambar 1). Zona bening tersebut terbentuk karena adanya degradasi CMC oleh bakteri *Bacillus* sp. T3. Hasil indeks selulolitik pada *Bacillus* sp. T3 menunjukkan nilai sebesar 2,21. Hal tersebut menandakan bahwa *Bacillus* sp. T3 memiliki enzim selulolitik.



Gambar 1. Aktivitas Selulolitik *Bacillus* sp. T3. A) Koloni bakteri *Bacillus* sp. T3. B) Zona bening yang terbentuk.

Isolasi dan Analisis ORF 6-Fosfo- β -glukosidase

Hasil amplifikasi PCR diperoleh amplikon yang memiliki ukuran ± 1400 bp pada gel agarose 1% (Gambar 2). Berdasarkan hasil *sequencing*, ORF 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 menunjukkan panjang nukleotida sebesar 1395 bp. Berdasarkan hasil analisis sekuen nukleotida menggunakan BLASTx, ORF 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 memiliki *identity* 94% dengan 6-Fosfo- β -glukosidase dari *Bacillus subtilis* AIX06058.1.



Gambar 2. Amplikon ORF 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 (Lajur M : marker; lajur 1 : pita ORF 6-Fosfo- β -glukosidase).



Analisis *In Silico* 6-Fosfo- β -glukosidase

Analisis *in silico* 6-Fosfo- β -glukosidase meliputi beberapa aspek yaitu analisis filogenetik, karakteristik fisikokimia, dan struktur protein 6-Fosfo- β -glukosidase.

Analisis Filogenetik 6-fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3

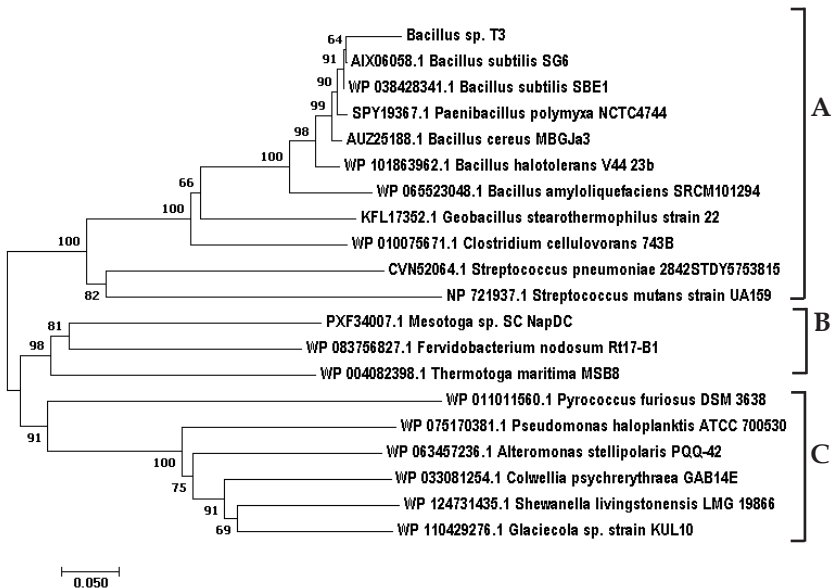
Analisis filogenetik dilakukan untuk mengetahui hubungan kekerabatan 6-fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 dengan homolognya dari kelompok psikrofilik, mesofilik, dan termofilik. Hasil analisis filogenetik menunjukkan bahwa secara umum 6-fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 memiliki kedekatan dengan kelompok mesofilik dan salah satu anggota dari kelompok termofilik yaitu *Geobacillus stearothermophilus* strain 22, namun memiliki jarak yang relatif jauh bila dibandingkan dengan kelompok termofilik ekstrem. Apabila dibandingkan dengan kelompok psikrofilik, 6-fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 memiliki jarak yang cukup jauh (Gambar 3).

Analisis Fisikokimia 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 dan Kelompok Bakteri Lainnya

Analisis fisikokimia meliputi panjang sekuen asam amino, berat molekul, GRAVY (*Grand Average of Hydropathicity*), rasio jumlah asam amino bermuatan basa (B) dan asam (A), rasio asam amino arginin (Arg) dan lisin (Lys), dan rasio asam amino alanin (Ala) dan glisin (Gly).

6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 memiliki panjang sekuen asam amino sebesar 464 asam amino dengan berat molekul berkisar ~53,95 kDa (Tabel 1). Kelompok bakteri mesofil memiliki rentang panjang sekuen asam amino sebesar 464 – 478 asam amino dan berat molekul rata-rata berkisar ~55,1 kDa. Kelompok bakteri termofil memiliki panjang sekuen asam amino sebesar 421 – 478 asam amino dan berat molekul rata-rata berkisar ~51,66 kDa. Sedangkan, kelompok bakteri psikrofil memiliki panjang sekuen asam amino sebesar 443 – 447 asam amino dan berat molekul rata-rata berkisar ~50,61 kDa.

Selain panjang sekuen asam amino dan berat molekul, GRAVY merupakan salah satu parameter yang dipertimbangkan untuk mengetahui solubilitas protein. GRAVY merupakan parameter yang mengukur nilai hidropati suatu protein tertentu. Apabila nilai GRAVY semakin negatif, maka protein tersebut lebih mudah berinteraksi dengan molekul air (Gupta *et al.*, 2014). 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 memiliki nilai GRAVY sebesar -0,533 (Tabel 1). Kelompok bakteri mesofil memiliki rata-rata nilai GRAVY sebesar -0,4908. Kelompok bakteri termofil memiliki rata-rata nilai GRAVY sebesar -0,403. Sedangkan, kelompok bakteri psikrofil memiliki rata-rata nilai GRAVY sebesar -0,341. Berdasarkan nilai GRAVY tersebut, 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 memiliki kelarutan yang rendah dibandingkan kelompok bakteri lainnya.



Gambar 3. Pohon filogenetik 6-fosfo- β -glukosidase. Pohon filogenetik dikonstruksi dengan metode *neighbour joining method* dan bootstrap 1000.

Analisis dilakukan menggunakan MEGA7 suite. A) kelompok bakteri mesofilik. B) Kelompok bakteri termofilik. C) Kelompok bakteri psikrofilik



Dalam analisis rasio asam amino basa dan asam (Tabel 1), 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 memiliki rasio B/A sebesar 0,89 (Tabel 1). Rata-rata rasio B/A yang dimiliki oleh kelompok bakteri mesofil sebesar 0,7719. Pada kelompok bakteri termofil, nilai rata-rata rasio B/A sebesar 0,813. Kelompok bakteri psikrofil memiliki nilai rata-rata rasio B/A yang paling rendah, yaitu 0,660.

Analisis rasio arginin dan lisin (Arg/Lys) menjadi salah satu parameter untuk mengetahui stabilitas suatu protein. Semakin tinggi nilai rasio arginin dan lisin, maka semakin tinggi stabilitas suatu protein. Rasio Arg/Lys 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 sebesar 0,606 (Tabel 1). Pada kelompok bakteri mesofil, rata-rata nilai rasio Arg/Lys adalah 0,664. Kelompok bakteri termofil memiliki rata-rata nilai rasio Arg/Lys sebesar 0,820 sedangkan pada kelompok bakteri psikrofil sebesar 0,793. 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 memiliki rasio arginin dan lisin yang hampir sama dengan kelompok bakteri mesofilik. Arginin dan lisin merupakan asam amino basa bermuatan positif yang sebagian besar terekspos pada permukaan protein. Kedua asam amino tersebut memainkan peran penting dalam stabilitas protein dengan membentuk interaksi elektrostatis (Sokalingam *et al.*, 2012). Meskipun keduanya berfungsi sebagai residu asam amino basa, arginin memberikan struktur protein yang lebih stabil dibandingkan dengan lisin karena struktur geometrisnya. Guanidinium dalam arginin memungkinkan adanya interaksi dalam tiga arah melalui tiga atom nitrogen asimetrisnya, sedangkan pada lisin hanya ada satu arah interaksi yang ada pada strukturnya. Hal tersebut memungkinkan arginin membentuk sejumlah besar interaksi elektrostatis seperti jembatan garam dan ikatan hidrogen yang mungkin menghasilkan interaksi yang lebih kuat daripada interaksi yang dihasilkan oleh lisin (Vieille dan Zeikus, 2001; Sokalingam *et al.*, 2012).

Tabel 1. Analisis Fisikokimia 6-Fosfo- β -glukosidase

Mikroorganisme	Panjang sekuen (asam amino)	Berat Molekul (kDA)	GRAVY	B/A	Arg/ Lys	Ala/ Gly
<i>Bacillus</i> sp. T3	464	53,95	-0,533	0,89	0,606	0,55
Kelompok bakteri mesofil	464 – 478	55,1	-0,4908	0,779	0,664	0,71
Kelompok bakteri termofil	421 – 478	51,66	-0,403	0,813	0,820	0,85
Kelompok bakteri psikrofil	443 – 447	50,61	-0,341	0,66	0,793	1,35

Selain rasio arginin dan lisin, stabilitas suatu protein juga dipengaruhi oleh asam amino alanin dan glisin (Ala/Gly). Berdasarkan pada tabel 1, diketahui bahwa rasio Ala/Gly 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 adalah sebesar 0,55 yang secara umum dapat dikatakan paling rendah dibandingkan dengan kelompok bakteri lainnya. Apabila dibandingkan dengan kelompok psikrofilik, nilai tersebut jauh lebih rendah. Hal ini mengindikasikan bahwa 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 bersifat lebih kaku (rigid) bila dibandingkan dengan enzim yang sama dari kelompok psikrofilik. Menurut Sriprapundh *et al.*, (2000), alanin merupakan residu asam amino yang membentuk heliks paling baik dibandingkan dengan asam amino lainnya. Alanin berkontribusi baik dalam stabilitas suatu protein. Glisin memiliki fleksibilitas konformasi lebih banyak dibandingkan dengan alanin. Oleh karena itu, glisin memiliki entropi yang lebih besar dibandingkan dengan alanin, sehingga banyak energi bebas yang diperlukan selama proses pelipatan (*folding*) untuk membatasi konformasi glisin (Matthews *et al.*, 1987).

Analisis Protein 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3

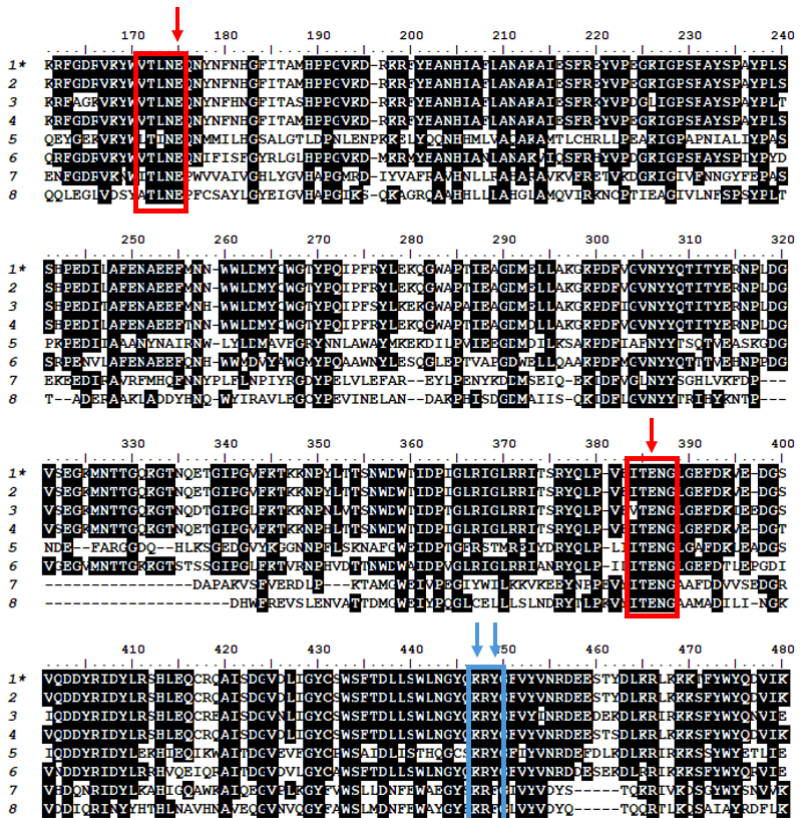
Analisis protein tersebut meliputi analisis residu katalitik dan struktur protein dari 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3.

6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 memiliki residu katalitik berupa residu glutamat yang berlokasi pada motif



"VTLNE" dan "ITENG" dan ditunjukkan dengan kotak berwarna merah pada gambar 4. Motif asam amino "VTLNE" dimiliki oleh hampir seluruh bakteri. Motif asam amino "ITENG" dimiliki oleh seluruh bakteri kecuali *Bacillus amyloliquefaciens*, yang mengalami mutasi dari isoleusin (I) menjadi valin (V). Namun karena I dan V memiliki karakter hidrofobik, maka mutasi tersebut tidak berdampak pada struktur protein secara global.

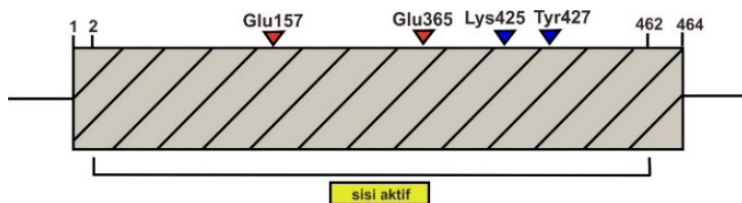
Selain itu, 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 memiliki sisi pengikatan gugus fosfat (*phosphate binding site*) berupa lisin (K) dan tirosin (Y) yang ditunjukkan pada tanda panah berwarna biru dan kotak berwarna biru. Umumnya, lisin memiliki peran dalam sisi pengikatan. Lisin mengandung muatan positif yang berada di rantai samping dan membentuk ikatan hidrogen dengan atom non-protein yang memiliki muatan negatif (Betts dan Russell, 2003). Residu lisin dimiliki oleh seluruh bakteri. Hal tersebut dapat diartikan residu lisin *conserved* di seluruh bakteri. Pada residu tirosin, bakteri termofil ekstrem dan psikrofil mengalami mutasi dari tirosin menjadi fenilalanin. Menurut Betts dan Russell (2003), umumnya tirosin berperan dalam fosforilasi, sedangkan fenilalanin berperan dalam pengenalan substrat. Mutasi tersebut tidak terlalu berdampak karena keduanya merupakan asam amino yang memiliki rantai samping aromatik dan memiliki fungsi yang tidak jauh berbeda. Lisin dan tirosin pada 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 diduga berfungsi sebagai sisi *subsite* untuk glukosa-6-fosfat. Michalska *et al.*, (2013) menyatakan bahwa 6-Fosfo- β -glukosidase dari *Lactobacillus plantarum* memiliki tiga residu yang berperan sebagai sisi pengikatan fosfat yaitu serin, lisin, dan tirosin.



Gambar 4. Penjajaran (*Alignment*) 6-Fosfo- β -glukosidase dari *Bacillus* sp. T3 dan bakteri lainnya. Tanda panah merah menunjukkan residu katalitik, yakni glutamat. Tanda panah biru menunjukkan residu sisi pengikatan fosfat yakni lisin dan tirosin. Kotak berwarna merah dan biru menunjukkan motif asam amino *conserved*.

Keterangan : 1*) *Bacillus* sp. T3 2) *Bacillus subtilis* (AIX06058.1) 3) *Bacillus amyloliquefaciens* (WP_065523048.1) 4) *Paenibacillus polymyxa* (SPY19367.1) 5) *Streptococcus pneumoniae* (CVN52064.1) 6) *Geobacillus stearothermophilus* (KFL17352.1) 7) *Thermotoga maritima* (WP_004082398.1) 8) *Pseudoalteromonas haloplanktis* WP_075170381. *Alignment* 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus subtilis* T3 dengan bakteri lainnya hanya memperlihatkan asam amino ke 161 sampai dengan 480.

Analisis struktur primer protein menunjukkan 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 hanya memiliki satu domain yaitu domain katalitik. Struktur 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 berbeda dengan kelompok glikosida hidrolase lainnya yang umumnya memiliki dua buah domain yaitu domain katalitik dan CBM (*Carbohydrate Binding Modul*). Domain katalitik 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 memiliki sisi aktif yang terletak pada residu asam amino nomor 2 hingga 462. 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 memiliki dua sisi katalitik yaitu Glu-157 dan Glu-365 (Gambar 5). Di sisi lain, 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 memiliki dua sisi pengikatan fosfat (*phosphate binding site*) yaitu Lys-425 dan Tyr-427. Kedua asam amino tersebut juga ditemukan pada 6-Fosfo- β -glukosidase dari *Streptococcus pneumoniae*. Berdasarkan penelitian Yu *et al.*, (2013), tiga residu asam amino (Ser-424, Lys-430, dan Tyr-432) pada 6-Fosfo- β -glukosidase dari *Streptococcus pneumoniae* berperan penting dalam seleksi hidrolisis substrat yang mengalami fosforilasi. Hal tersebut diperkuat dengan penelitian dari Yang *et al.*, (2013) yang menyatakan bahwa ketiga asam amino tersebut sebagai “*Gate keeper*” dalam mekanisme katalitik 6-*phospho*- β -Glucosidase. Ketiga asam amino tersebut berfungsi sebagai sisi pengenalan substrat yang telah terfosforilasi.

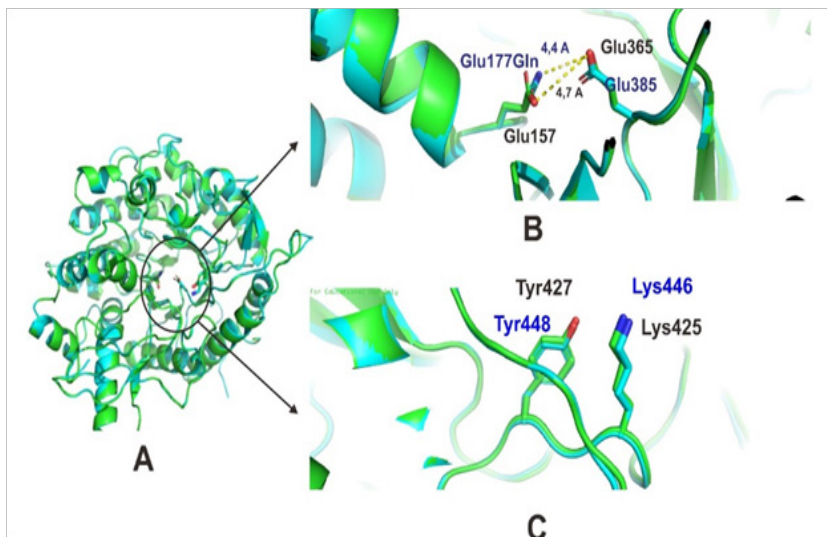


Gambar 5. Struktur primer 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp.T3

6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 memiliki 14 kelompok residu asam amino yang membentuk lembaran (β -strands) dan 15 kelompok residu asam amino yang membentuk heliks (α -heliks). Residu katalitik Glu-157 terletak di sekitar β 5 dan Glu-365 terletak di β 10. Sedangkan, residu Lys-425 dan Tyr-427 berada di β 12.

Struktur tersier 6-fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 memiliki kemiripan dengan struktur tersier 6-fosfo- β -Galaktosidase *Geobacillus stearothermophilus* (kode PDB : 4ZE5) (Gambar 6A). 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 termasuk ke dalam topologi protein α/β TIM barrel. Topologi 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 sama dengan kelompok enzim famili GH1 pada umumnya. Dua residu katalitik 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 yaitu Glu-157 dan Glu-365 memiliki orientasi yang sama dengan residu katalitik 4ZE5 yaitu Glu-177-Gln dan Glu-385 (Gambar 6B). Jarak antara dua residu katalitik 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 sebesar 4,7 Å. Jarak tersebut tidak berbeda jauh dengan jarak dua residu katalitik 4ZE5 yaitu 4,4 Å. Selain itu, dua residu pengikatan fosfat 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 yaitu Lys-425 dan Tyr-427 juga memiliki orientasi yang sama dengan residu sisi pengikatan fosfat 4ZE5 yaitu Lys-446 dan Tyr-448 (Gambar 6C).

Apabila dilakukan *superposition* dengan 4ZE5 didapatkan nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) sebesar 0,168. Nilai RMSD tersebut lebih rendah dibandingkan dengan nilai RMSD antara 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 dengan 6-Fosfo- β -glukosidase *Escherichia coli* K-12 (Kode PDB : 2XHY) dan 6-Fosfo- β -glukosidase *Streptococcus mutans* UA159 (Kode PDB : 4F79). Nilai RMSD orf 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 dengan 2XHY sebesar 2.089. Sedangkan nilai RMSD 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 dengan 4F79 sebesar 0.996. Menurut Reva *et al.*, (1998), nilai RMSD umum digunakan sebagai parameter kesamaan di antara dua struktur protein berdasarkan atom-atom dari protein tersebut. Semakin kecil nilai RMSD di antara dua struktur protein tersebut, semakin mirip struktur kedua protein tersebut. Berdasarkan hal tersebut, struktur 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 memiliki kesamaan struktur dengan 6-phospho- β -Galactosidase *Geobacillus stearothermophilus*.



Gambar 6. A) *Superposition* 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 dan 4ZE5, B) Residu Katalitik 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 dan 4ZE5, C) Residu Sisi Pengikatan Fosfat 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 dan 4ZE5.

Kesimpulan

Open reading frame (ORF) 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 memiliki ukuran nukleotida sebesar 1395 bp. Produk ORF 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 memiliki kemiripan dengan *Bacillus subtilis* dan karakteristik yang mirip dengan kelompok bakteri termofil. Perlu dilakukan kloning dan ekspresi hasil kloning orf 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3 untuk mengetahui lebih mendalam karakteristik 6-Fosfo- β -glukosidase *Bacillus* sp. T3

Ucapan Terima Kasih

Saya mengucapkan terima kasih kepada Bapak M. Saifur Rohman dan Bapak Jaka Widada selaku Dosen Pembimbing Penelitian. Saya juga mengucapkan terima kasih kepada Departemen Mikrobiologi Pertanian dan mahasiswa penelitian lainnya yang telah mendukung penelitian saya.

Kontribusi Penulis

SP, MSR, dan JK melakukan perencanaan penelitian. MSR melakukan desain primer yang akan digunakan untuk isolasi orf gen. SP melakukan isolasi orf dengan metode PCR dan analisis data. Seluruh penulis membaca dan melakukan verifikasi manuskrip yang telah dibuat.

Competing Interest

Penulis menyatakan bahwa tidak ada konflik kepentingan.

Daftar Pustaka

- Ahmed A., F. U. Nasim, K. Batool and A. Bibi. 2017. Microbial β -glucosidase: sources, production and applications. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 5 : 31-46.
- Betts, M. J., and R. B. Russell. 2003. Amino acid properties and consequences of substitutions. *Bioinformatics for Geneticists*, 290 – 316.
- Gupta, P., K. Samant, and A. Sahu. 2012. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *International Journal of Microbiology*, 2012 : 1-5.
- Gupta, P., S.Verma, and J.Vakhlu. 2014. Comparative analysis of b-glucosidases thermostability: differences in amino acids composition and distribution among mesostable and thermostable b-glucosidases. *Journal of Advanced Bioinformatics Applications and Research*, 5 : 215 – 227.
- Koeck, D.E., A. Pechtl, V.V. Zverlov, and W. H. Schwarz. 2014. Genomics and cellulolytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 29 : 171 – 183.
- Li, H., X. Xu, H. Chen, Y. Zhang, J. Xu, J. Wang, and X. Lu. 2013. Molecular analyses of the functional microbial community in composting by PCR-DGGE targeting the genes of the β -glucosidase. *Bioresource technology*, 134 : 51-58.
- Matthews, B.W., H. Nicholson, and W.J. Becktel. 1987. Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84 : 6663-6667.



- Michalska, K., K. Tan, H. Li, C. Hatzos-Skintges, J. Bearden, G. Babnigg, and A. Joachimiak. 2013. GH1-family 6-P- β -glucosidases from human microbiome lactic acid bacteria. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 69 : 451–463.
- Reva, B. A., A.V. Finkelstein, and J. Skolnick. 1998. What is the probability of a chance prediction of a protein structure with an rmsd of 6 Å?. *Folding and Design*, 3 : 141–147.
- Sriprapundh, D., C. Vieille, and J.G. Zeikus. 2000. Molecular determinants of xylose isomerase thermal stability and activity : analysis of thermozymes by site-directed mutagenesis. *Protein Engineering*, 13 : 259 – 265.
- Tobisch, S., P. Glaser, S. Krüger, and M. Hecker . 1997. Identification and characterization of a new beta-glucoside utilization system in *Bacillus subtilis*. *Journal Bacteriology*, 179 : 496-506.
- Vieille, C., and G.J. Zeikus. 2001. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65 : 1–43.
- Yu, W.L., Y.L. Jiang, A. Pikis, W. Cheng, X.H. Bai, Y.M. Ren, J. Thompson, C.Z. Zhou, and Y. Chen. 2013. Structural insights into the substrate specificity of a 6-Fosfo- β -glukosidase BglA-2 from *Streptococcus pneumoniae* TIGR4. *Journal of Biological Chemistry*, 288 : 14949–14958.
- Zhang, J., and A. Aronson. 1994. A *Bacillus subtilis* bglA gene encoding phospho- β -glucosidase is inducible and closely linked to a NADH dehydrogenase-encoding gene. *Gene*, 140 : 85–90.

Pengaruh *Freeze-drying* dengan Perlakuan Dehidrasi Osmosis terhadap Kadar Air, Aktivitas Air, Total Bakteri, dan Vitamin C pada Buah Pepaya (*carica papaya* l.)

Siti Atarfa Rahmida^{1*}, Isty Adhitya Purwasena²,
dan Dea Indriani Astuti³

¹Program Studi Teknologi Pascapanen, Institut Teknologi Bandung
Kampus Jatiningor, Jalan Let. Jend. Purn. Dr. (HC) Mashudi No. 1,
Kecamatan Jatiningor, Kabupaten Sumedang, 45363, Indonesia

^{2,3} Program Studi Mikrobiologi Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati,
Institut Teknologi Bandung Jalan Ganesha No. 10, Bandung, 4012,
Indonesia.

Abstrak. Pepaya sebagai komoditas yang mempunyai banyak manfaat didukung juga dengan penanamannya yang tidak memerlukan lahan yang luas dan produksi buah sepanjang tahun. Pepaya mengalami susut kuantitas pada setiap saluran pemasaran. Salah satu cara untuk dapat mempertahankan kualitas buah pepaya dan menambah nilai jualnya adalah pengolahan lebih lanjut, seperti *freeze-drying*. *Freeze-drying* adalah pengeringan menggunakan suhu rendah dan metode paling baik untuk mempertahankan kualitas bahan pangan. Proses *freeze-drying* yang membutuhkan waktu yang lama memerlukan perlakuan sebelum *freeze-drying* dilakukan untuk memperpendek waktu, seperti dehidrasi osmosis. Dehidrasi osmosis dilakukan dengan kombinasi konsentrasi gula 30%, 40%, dan 50%, suhu 29°C, 42°C, dan 55°C, dan waktu osmosis 2, 3,5, dan 5 jam yang dimodelkan menggunakan Design Expert 11, RSM CCD, dengan respon KA, TPT, dan WR. Dari *pretreatment* dehidrasi osmosis didapatkan respons delta kadar air dengan R^2 0,8923, dengan persamaan $KA(\Delta\%) = -4,63473 + 0,258845 \times \text{Konsentrasi} + 1,35257 \times \text{Waktu} + 0,083462 \times \text{Suhu}$. Setelah model divalidasi diperoleh kondisi optimum dehidrasi osmosis adalah konsentrasi 30%, suhu 55°C, dan waktu osmosis 4,553 jam. Hasil optimasi kemudian diproses dengan skala industri 14 jam yang kemudian dianalisis kadar air, aktivitas air, total bakteri, dan vitamin C. Hasil *freeze drying* dengan *pretreatment* dehidrasi osmosis menunjukkan KA, a_w , Total



Bakteri, yang tidak signifikan berbeda dan vitamin C *pretreatment* yang signifikan lebih rendah dari kontrol.

Kata kunci: *dehidrasi osmosis, freeze-drying, kadar air, aktivitas air, total bakteri, vitamin C*

Pendahuluan

Buah pepaya (*Carica papaya* L.) adalah salah satu komoditas buah tropis yang biasa dikonsumsi langsung dan mempunyai banyak manfaat diantaranya mengandung nutrisi dengan komposisi paling banyak yaitu vitamin A, vitamin C, dan enzim papain (Susanti *et al.*, 2016), selain dikonsumsi langsung sebagai buah segar, pepaya juga banyak dimanfaatkan dalam industri makanan, tekstil, dan farmasi. Pepaya sebagai komoditas yang mempunyai banyak manfaat ini didukung juga dengan kemudahan penanamannya yang tidak memerlukan lahan yang luas dan produksi buahnya yang cepat sepanjang tahun (Luketsi dan Nugroho, 2011). Pepaya juga merupakan komoditas buah nasional dengan produksi keenam terbesar dengan jumlah produksi sebanyak 875.112 ton pada tahun 2017, namun pepaya bukan merupakan komoditas ekspor (BPS, 2018). Negara pengimpor pepaya terbesar adalah Amerika Serikat, dengan 98% produk dijual sebagai buah segar, dan hanya 2% saja yang diolah (Evans *et al.*, 2018).

Pepaya sebagai produk hortikultura mempunyai sifat mudah rusak (*perishable*) sehingga diperlukan penanganan pascapanen yang baik. Kegiatan pascapanen buah pepaya meliputi pengumpulan, grading dan penyortiran, distribusi, pembersihan dan pencucian, pemberian label dan kemasan, dan penyimpanan. Pada rantai pascapanen pepaya di Indonesia, khususnya Provinsi Jawa Barat dan Jawa Tengah, terdapat susut kuantitas yang besarnya berbeda pada setiap saluran pemasaran, yaitu sebesar 0-15% pada tingkat supplier, 7-20% pada tingkat pengecer, dan 4-25% pada tingkat pengecer dan pedagang grosir. Susut kuantitas ini dapat diakibatkan oleh faktor fisiologis, mekanis, dan biologis (Pujasari, 2012). Untuk mengurangi susut kuantitas dan kualitas yang disebabkan oleh ketiga

faktor tersebut dan juga memperpanjang masa simpan buah pepaya, diperlukan pengawetan buah pepaya yang dapat dilakukan dengan pengeringan. Pengeringan dapat menghambat aktivitas enzim dan pertumbuhan mikroorganisme yang dapat merusak buah pepaya. Freeze-drying adalah metode pengeringan yang paling baik untuk mempertahankan nutrisi yang ada pada produk biologi. Meskipun merupakan metode pengeringan yang paling baik, freeze-drying membutuhkan waktu pengeringan yang lebih lama dan dengan biaya yang lebih mahal. Salah satu cara untuk dapat mengurangi waktu pengeringan freeze-drying adalah metode perlakuan awal dehidrasi osmosis. Dehidrasi osmosis bertujuan untuk mengeluarkan massa air melalui membran dari bagian tengah ke permukaan bahan akibat adanya perbedaan konsentrasi pada larutan. Berkurangnya masa awal air pada perlakuan dehidrasi osmosis (Wirawan dan Anasta, 2013). Proses osmosis adalah proses perpindahan yang melibatkan membran semipermeabel dimana pelarut yang konsentrasinya lebih tinggi (hipertonik) berpindah ke pelarut yang konsentrasinya lebih rendah (hipotonik), sampai kedua larutan tersebut dalam keadaan setimbang (isotonik). Pengeringan dengan proses ini cocok untuk diterapkan pada buah dan sayuran karena kerusakan yang minimal dan membran semipermeabel alami yang dimiliki oleh buah dan sayuran. Perpindahan massa air dari dalam buah atau sayuran (larutan hipotonik) ke larutan hipertonik didorong oleh perbedaan tekanan osmosis. Faktor yang mempengaruhi dehidrasi osmosis adalah lama waktu perlakuan, suhu, konsentrasi larutan, dimana semakin tinggi suhu dan konsentrasi maka penurunan kadar air pada sampel semakin tinggi (Hermawan, 2015). Pada buah membran semipermeabel terdapat pada struktur permukaannya yang berpori-pori. Pada prosesnya, dehidrasi osmosis menggunakan larutan pekat, dapat mengurangi kadar air buah yang direndam sebanyak 50% atau disebut juga partial dehydration. Proses dehidrasi osmosis dipengaruhi oleh ratio buah yang dikeringkan dan larutan osmosis, suhu, pengadukan dan jenis agen osmosis atau jenis larutan osmosis (Wirawan dan Anasta, 2013).

Banyaknya manfaat pepaya, keunggulan tanaman pepaya, jumlah produksi buah pepaya yang besar, dan potensinya untuk



dikembangkan sebagai buah kering, membuat upaya untuk mengembangkan potensi buah pepaya terus dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh freeze-drying pada buah pepaya dengan pemberian perlakuan awal dehidrasi osmosis dengan parameter konsentrasi, suhu, dan waktu yang optimum. Hasil optimasi kemudian diproses *freeze-drying* skala 14 jam yang kemudian dianalisis kadar air, aktivitas air, total bakteri dan vitamin C.

Metode Penelitian

Waktu dan Lokasi

Penelitian dilakukan dari bulan Juni 2019 sampai September 2019 di Laboratorium Biomassa, Labtek IA ITB Kampus Jatiningor. Jalan Let. Jend. Purn. Dr. (HC) Mashudi No. 1, Sayang, Jatiningor, Sumedang, Jawa Barat.

Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian dilakukan berdasarkan aplikasi Design Expert 11 Response Surface Methodology (RSM), Central Composite Design (CCD), face-centered dengan respon berupa kadar air (KA), Total Padatan Terlarut (TPT), dan weight reduction (WR).

Prosedur Dehidrasi Osmosis

Pembuatan larutan osmosis dilakukan dengan menambahkan gula sebanyak 15, 20, 25 gram ke dalam 50 ml aquades sehingga konsentrasi larutan osmosis adalah 30%, 40%, dan 50% (w/v). Sampel buah pepaya didapatkan dari pasar lokal Gede Bage dengan kriteria °Brix 11-14. Dehidrasi osmosis dilakukan dengan memasukkan sampel buah pepaya yang sudah dipotong kotak dengan ukuran panjang, lebar, dan tinggi berkisar 7-8 mm, ditimbang sebanyak 20 kotak, dan dimasukkan kedalam larutan osmosis gula dengan konsentrasi 30%, 40%, 50%, kemudian dimasukkan ke dalam waterbath dengan suhu 29°C, 42°C, dan 55°C dengan waktu selama 2, 3,5, dan 5 jam. Rancangan orde kedua menggunakan CCD RSM tiga variabel bebas yaitu

Tabel 1. Design of Experiment

Std	Perlakuan	Coded			Actual		
		Konsentrasi	Waktu	Suhu	Konsentrasi	Waktu	Suhu
1	8	-1	-1	-1	30	2	29
2	15	1	-1	-1	50	2	29
3	10	-1	1	-1	30	5	29
4	5	1	1	-1	50	5	29
5	13	-1	-1	1	30	2	55
6	3	1	-1	1	50	2	55
7	4	-1	1	1	30	5	55
8	2	1	1	1	50	5	55
9	14	-1	0	0	30	3,5	42
10	12	1	0	0	50	3,5	42
11	1	0	-1	0	40	2	42
12	19	0	1	0	40	5	42
13	7	0	0	-1	40	3,5	29
14	16	0	0	1	40	3,5	55
15	20	0	0	0	40	3,5	42
16	17	0	0	0	40	3,5	42
17	9	0	0	0	40	3,5	42
18	11	0	0	0	40	3,5	42
19	18	0	0	0	40	3,5	42
20	6	0	0	0	40	3,5	42

konsentrasi larutan (X1), waktu perendaman (X2), dan suhu (X3), dengan titik pusat yang dinotasikan dengan angka 0 yaitu, konsentrasi 40%, waktu perendaman 3,5 jam, dan suhu 44°C.

Penentuan Kadar Air

Penentuan kadar air setelah dilakukan dehidrasi osmosis adalah dengan metode gravimetri dengan sampel dimasukkan ke dalam wadah (misalnya cawan) yang ditimbang terlebih dahulu, massa sampel awal adalah masa awal (W0), setelah itu sampel dan wadah dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 105°C selama 24 jam atau sampai berat konstan, setelah itu sampel dikeluarkan dan ditimbang sehingga didapatkan massa sampel kering (W1). Kadar air kemudian ditentukan dengan persamaan berikut (Magdalena *et al.*, 2014).

$$\text{Kadar air (\%b/b)} = \frac{w_0 - w_1}{w_0} \times 100\%$$

Dimana : W0 : massa awal; W1: massa sampel kering



Penentuan Total Padatan Terlarut

Total padatan terlarut diukur dengan menggunakan refraktometer yang menyatakan total padatan terlarut dalam satuan °Brix, pengambilan sampel dilakukan dengan cara menggerus daging buah pepaya dan sari buah pepaya ditaruh pada sensor refraktometer. Pengukuran TPT setiap sampel diulang sebanyak tiga kali.

Penentuan Weight Reduction

Penentuan weight reduction dilakukan dengan cara menimbang sampel buah pepaya sebelum dilakukannya dehidrasi osmosis sebagai (W_0), setelah perlakuan dehidrasi osmosis selama 2, 3,5, atau 5 jam sampel ditiriskan selama 3 jam dan ditimbang (W_t). Weight reduction dihitung dengan persamaan berikut (Magdalena *et al.*, 2014).

$$\text{Weight Reduction (\%)} = \frac{w_0 - w_t}{w_0} \times 100\%$$

Dimana : W_0 : massa awal ; W_t : massa akhir setelah perlakuan

Penentuan Vitamin C dengan Metode Iodometri (Astria *et al.*, 2018)

Sebanyak 20 g pepaya yang sudah diblender dimasukkan ke dalam labu ukur 200 ml kemudian tambahkan aquades sampai batas, saring untuk memisahkan filtrat untuk dijadikan sampel.

Larutan Iodin 0,01N

Sebanyak 0,645 g iodin dan 1,7 gram KI dilarutkan dengan aquades sedikit demi sedikit sampai larut sempurna, lalu pindahkan larutan dalam labu ukur 500 ml dan tambahkan aquades sampai batas. Kemudian distandarisasi dengan natrium tiosulfat.

Larutan Amilum 1%

Sebanyak 0,5 g amilum dilarutkan dengan 50 ml air panas dalam gelas kimia, digunakan sebagai indikator.

Titration Vitamin C

Sebanyak 50 ml ekstrak buah pepaya dimasukkan ke dalam erlenmeyer 125 ml, lalu ditambahkan 6 ml H_2SO_4 10% dan 3 tetes 1% amilum. Titration dengan larutan iodine 0,01 N sampai larutan menjadi warna biru. Kadar vitamin C kemudian dihitung dengan persamaan berikut.

$$\text{Vitamin C} = \frac{\text{Viodine} \times 0,88 \times \frac{200}{50} \times 100}{\text{massa sampel}}$$

$$1 \text{ ml } 0,01 \text{ N I}_2 = 0,88 \text{ mg Vitamin C}$$

Determination of Activity of Air (aw)

Activity of air (aw) is determined using an aw meter. Before testing is performed, the instrument is calibrated using salts BaCl_2 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, NaCl, and KCl. The sample is then placed in the aw meter which has been calibrated and allowed to stabilize until the aw value is visible on the screen (Kristyaningsih, 2017).

Total Bacteria

Total Plate Count (TPC) of bacteria in the sample which has been freeze-dried is performed by taking a sample of 1 g and performing serial dilution up to 10^{-5} . 0,1 ml of serial dilution 10^{-3} - 10^{-5} is placed in a petri dish containing nutrient agar (NA), then continued by spreading the sample until the agar dries. Bacteria are counted after incubation at room temperature for 24 hours.

Statistical Analysis

The results of osmotic dehydration, analysis of variance, and optimization using *Response Surface Methodology* (RSM), *Central Composite Design* (CCD), *face centered* in Design Expert 11 and testing after freeze-drying analysis independent T-test using IBM SPSS Statistics 24.

Hasil dan Pembahasan

Hasil penelitian yang dilakukan dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Data Hasil Dehidrasi Osmosis Pepaya dengan 3 Variabel Bebas

Perlakuan	Konsentrasi (%)	Waktu (jam)	Suhu (°C)	KA ($\Delta\%$)	TPT (°Brix)	WR (%)
1	40	2	42	12,70	25,22	21,66
2	50	5	55	19,04	32,15	22,11
3	50	2	55	16,68	28,81	25,10
4	30	5	55	13,93	25,23	21,31
5	50	5	29	19,08	31,85	29,18
6	40	3,5	42	14,58	27,23	17,94
7	40	3,5	29	12,13	26,58	25,58
8	30	2	29	7,95	21,81	21,53
9	40	3,5	42	14,10	29,15	19,33
10	30	5	29	12,63	26,07	25,82
11	40	3,5	42	15,13	27,54	17,89
12	50	3,5	42	14,50	31,06	23,07
13	30	2	55	10,44	23,5	23,30
14	30	3,5	42	11,09	24,01	22,13
15	50	2	29	12,62	24,82	26,68
16	40	3,5	55	15,17	29,02	20,45
17	40	3,5	42	12,80	25,97	15,23
18	40	3,5	42	14,78	28,04	23,49
19	40	5	42	15,99	28,36	22,12
20	40	3,5	42	13,75	26,22	22,50

ANOVA hasil penelitian dapat dilihat pada tabel 3.

Dehidrasi osmosis pepaya dipengaruhi berbagai faktor, utamanya dipengaruhi oleh faktor konsentrasi larutan, waktu osmosis, dan suhu osmosis. Tiga faktor utama tersebut mempengaruhi hasil respon kadar air, TPT, dan weight reduction. Dari hasil dehidrasi osmosis diharapkan hasil kadar air maksimal, TPT minimal, dan weight reduction maksimal. Hasil pengamatan yang dapat dilihat pada tabel 2., menunjukkan kadar air maksimal adalah perlakuan 5 (konsentrasi 50%, waktu 5 jam, suhu 29°C) yaitu sebesar 19,0841 dalam $\Delta\%$, TPT minimal pada perlakuan 8

(konsentrasi 30%, waktu 2 jam, suhu 29°C) yaitu sebesar 21,8111 °brix, dan weight reduction maksimal adalah 5 yaitu sebesar 29,1898%.

Ringkasan Analysis of variance (ANOVA) hasil penelitian yang dapat dilihat pada tabel 3., menunjukkan bahwa respon terhadap kadar air ($\Delta\%$) dengan model linear memberikan hasil yang signifikan dengan $p\text{-value} < 0,05$ yaitu $< 0,0001$, $F\text{-value}$ yang lebih besar dari F hitung yaitu sebesar 44,19, dan R^2 sebesar 0,8923. Respon terhadap TPT dengan model linear menunjukkan hasil yang signifikan dengan $p\text{-value} < 0,05$ yaitu $< 0,0001$, $F\text{-value}$ yang lebih besar dari F hitung yaitu sebesar 33,49, dan R^2 sebesar 0,8552. Respon terhadap weight reduction menunjukkan hasil yang tidak signifikan pada model quadratic dengan $p\text{-value} > 0,05$ yaitu 0,0714, $F\text{-value}$ yang lebih kecil dari $F\text{-hitung}$ yaitu 2,66, dan R^2 sebesar 0,7057.

Tabel 3. Ringkasan Analysis of Variance (ANOVA) Hasil Dehidrasi Osmosis

Response	Model	F-value	p-value	R-square	
Kadar Air ($\Delta\%$)	Linear	44,19	$< 0,0001$	0,8923	Significant
TPT (°Brix)	Linear	33,49	$< 0,0001$	0,8552	Significant
Weight Reduction (%)	Quadratic	2,66	0,0714	0,7057	Not Significant

*signifikan pada $p < 0,05$

Analisis Kadar Air

Parameter kadar air pada proses dehidrasi osmosis penting untuk diketahui karena produk diharapkan mempunyai kadar air serendah mungkin untuk dapat disimpan dalam waktu yang lebih panjang, perubahan kadar air pada proses dehidrasi osmosis ini dapat dipengaruhi oleh konsentrasi larutan, waktu dan suhu dehidrasi osmosis. Pada proses dehidrasi osmosis, air berpindah akibat adanya tekanan osmosis karena perbedaan konsentrasi larutan gula dan sampel. Pada awal proses dehidrasi osmosis, air yang dikeluarkan merupakan air bebas sehingga dehidrasi air terjadi lebih cepat, dan akan lebih lambat pada akhir proses dehidrasi osmosis karena pada akhir proses dehidrasi osmosis,

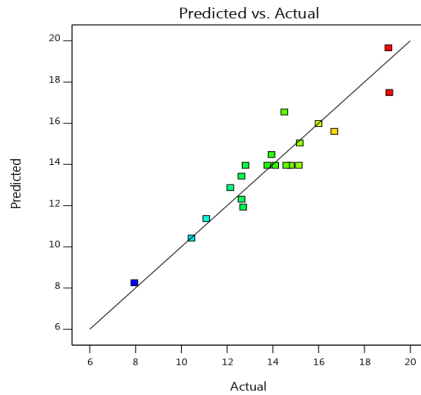


air yang didehidrasi merupakan air terikat yang berdifusi dari bagian dalam sampel ke bagian permukaan dan pengurangan konsentrasi gula (walaupun sangat kecil, $\pm 1^\circ \text{brix}$), dapat membuat kemampuan larutan osmosis mengeluarkan air akan berkurang (Yuliana, 2012).

Hasil penelitian menunjukkan variasi kadar air adalah 7,9508 sampai 19,0841 $\Delta\%$. Variabel bebas konsentrasi, waktu, dan suhu pada gambar 1., memperlihatkan bahwa ketiganya berpengaruh signifikan terhadap variabel terikat kadar air dengan p-value $< 0,05$ sebesar 0,0001 pada model linear. Nilai Lack of fit lebih besar dari α (0.05) yaitu sebesar 0,3682, menunjukkan bahwa sebaran data sudah cukup digambarkan oleh model, sehingga model ini dapat digunakan. Nilai koefisien determinasi (R^2) dari respon kadar air penelitian ini adalah 0,8923, dengan perbedaan nilai antara **Predicted R^2** dan **Adjusted R^2** kurang dari 0,2 yang sangat wajar, dan nilai Adeq Precision yang mengukur ratio antara signal dan noise yang lebih dari 4 menunjukkan bahwa model dapat digunakan untuk menavigasi ruang desain. Nilai R^2 tersebut menjelaskan bahwa 89% data hasil penelitian merupakan pengaruh dari variabel bebas perlakuan, dan 11% sisanya berasal dari faktor lain yang tidak diamati Interaksi ketiga variabel bebas tersebut dimodelkan pada persamaan 1:

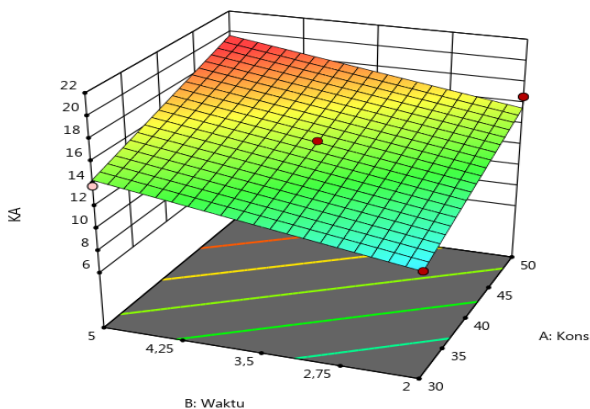
Persamaan 1: $\text{KadarAir}(\Delta\%) = - 4,63473 + 0,258845 \times \text{Konsentrasi} + 1,35257 \times \text{Waktu} + 0,083462 \times \text{Suhu}$

Persamaan 1 digunakan untuk memperoleh respon $\Delta\%$ kadar air yang dapat dilihat perbandingan nilai prediksi dan aktualnya pada gambar 1., serta dapat digunakan untuk memvalidasi hasil optimasi pada tabel 4., dengan R^2 sebesar 0,8923 yang menunjukkan bahwa model yang dihasilkan cukup baik dan data yang dihasilkan (aktual) hampir seragam.

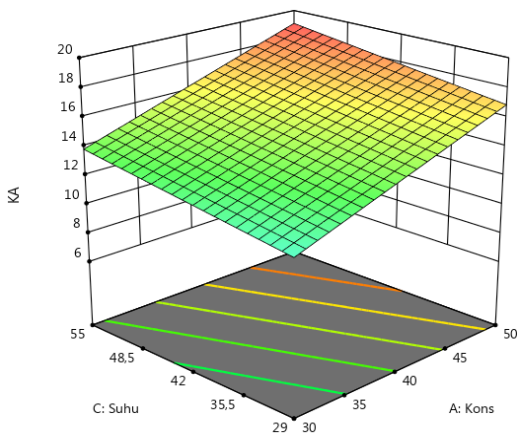


Gambar 1. Grafik Predicted vs Actual Respon Kadar Air dalam $\Delta\%$

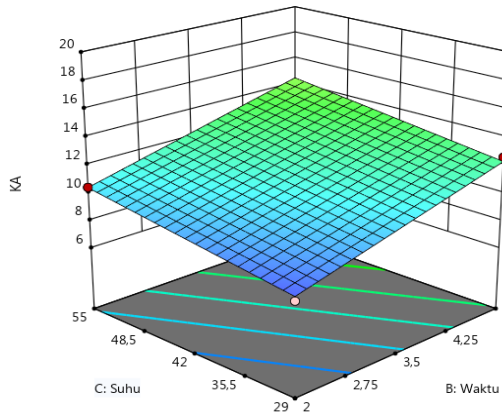
Hasil ANOVA dimana variabel terikat suhu, konsentrasi, dan waktu memberikan pengaruh signifikan terhadap respon kadar air. Berdasarkan gambar 2., dapat dilihat bahwa pengaruh waktu dan konsentrasi adalah positif, dan juga ditunjukkan dengan warna kontur dimana semakin tinggi waktu dan konsentrasi maka hasil $\Delta\%$ kadar air semakin besar. Hal ini sesuai dengan penelitian An *et al.* (2013) yaitu, peningkatan konsentrasi dan waktu perendaman, menyebabkan proses keluarnya air meningkat, sehingga kadar air menurun lebih cepat dan lebih lambat saat menuju titik kesetimbangan konsentrasi larutan. Pada awal proses osmosis keluarnya air dari sel cenderung lebih tinggi karena perbedaan tekanan osmosis yang lebih tinggi antara larutan dan sampel. Temperatur yang tinggi menyebabkan kadar air menurun lebih cepat karena suhu yang tinggi membuat molekul air bergerak lebih cepat melalui membran sel dan menurunkan viskositas medium osmosis.



Gambar 2. 3D *Surface Respon* Kadar Air dalam $\Delta\%$ terhadap Konsentrasi dan Waktu dengan *Actual Factor/Hold Factor* Suhu Optimum 55°C



Gambar 3. 3D *Surface Respon* Kadar Air dalam $\Delta\%$ terhadap Konsentrasi dan Suhu dengan *Actual Factor/Hold Factor* Waktu Optimum 4,5 jam



Gambar 4. 3D Surface Respon Kadar Air dalam $\Delta\%$ terhadap Waktu dan Suhu dengan *Actual Factor/Hold Factor* Konsentrasi Optimum 30%

Dari ketiga faktor yang mempengaruhi osmosis pepaya, dapat dilihat dari kontur 3D Surface Respon bahwa faktor konsentrasi memberikan pengaruh paling besar terhadap penurunan kadar air pada osmosis, yang sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Yudistira (2013). Berdasarkan gambar 2, 3, dan 4, dapat dilihat bahwa ketiga faktor waktu, suhu, dan konsentrasi larutan osmosis memberikan pengaruh yang berbanding lurus dengan besarnya penurunan kadar air pada osmosis buah pepaya. Dapat dilihat bahwa semakin besar konsentrasi, suhu, dan semakin lama waktu perlakuan, maka penurunan kadar air akan semakin besar yang sesuai dengan penelitian An *et al.* (2013).

Optimalisasi

Hasil penelitian dioptimasi pada software Design Expert 11 dengan kriteria variabel bebas konsentrasi, suhu, dan waktu in range, respons kadar air maksimal, TPT minimal, dan weight reduction none, dikarenakan respon weight reduction tidak signifikan. Digunakan persamaan orde dua untuk menentukan kondisi optimum pada setiap respon menghasilkan optimasi dengan variabel bebas konsentrasi sebesar 30%, suhu sebesar 55°C,



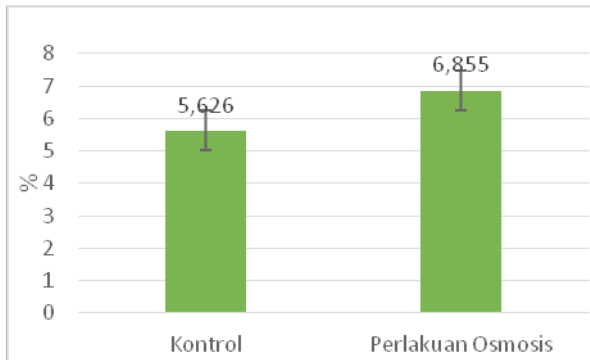
dan waktu 4,551 jam, variabel optimum ini ditentukan dengan berdasarkan nilai desirability terbesar (mendekati 1) yaitu 0,542. Prediksi respon optimasi pada variabel terikat kadar air adalah 13,877 $\Delta\%$, TPT sebesar 26,453 $^{\circ}\text{brix}$, dan weight reduction sebesar 21,403%. Hasil optimasi kemudian di validasi di laboratorium dengan hasil respon yang dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Validasi Optimasi

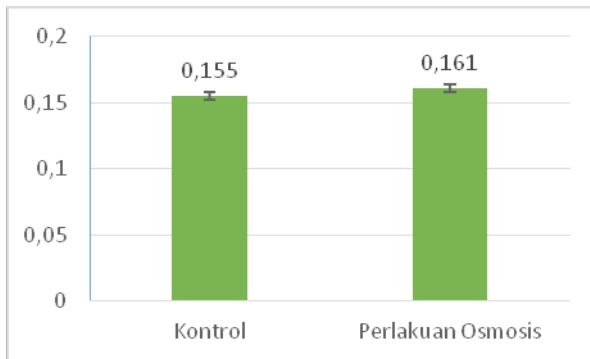
	Prediksi	Validasi
KA ($\Delta\%$)	13,877	13,140
TPT ($^{\circ}\text{brix}$)	26,453	26,200
WR (%)	21,403	22,527

Kadar Air Aktivitas Air (a_w) setelah Freeze-Drying

Derajat aktivitas air dalam bahan pangan yang terkait dengan kadar air, secara kimiawi dan biologis, digambarkan sebagai aktivitas air (a_w). Nilai aktivitas air berkisar antara 0-1. Aktivitas air penting untuk diketahui karena mempengaruhi kualitas bahan makanan dan masa simpan bahan, dimana semakin kecil nilai aktivitas air maka semakin lama masa simpan bahan makanan, dan sebaliknya. Masa simpan bahan ini terkait dengan aktivitas mikroba yang mempunyai rentang nilai aktivitas air tertentu seperti untuk pertumbuhan bakteri memerlukan a_w minimum 0,9, kapang memerlukan a_w sebesar 0,6-0,7, dan khamir memerlukan a_w sebesar 0,8-0,9. Untuk mengurangi aktivitas air dalam bahan pangan dapat dilakukan dengan cara pengeringan (Leviana dan Paramita, 2017). Aktivitas air setelah freeze-drying pada sampel kontrol adalah 0,155 dan pada perlakuan osmosis adalah 0,161 adalah hasil cukup baik, berdasarkan penelitian Arya *et al.* (1983), kadar air pepaya setelah freeze drying berkisar antara 6-7% dengan nilai a_w 0,22-0,33, memberikan masa simpan paling optimal.



Gambar 5. Kadar Air (KA) setelah Freeze-Drying



Gambar 6. Aktivitas Air (a_w) setelah Freeze-Drying

Kadar air setelah freeze-drying menunjukkan pengurangan yang tinggi, namun kadar air setelah freeze-drying pada sampel kontrol dan perlakuan osmosis tidak menunjukkan perbedaan signifikan, begitu pula dengan nilai aktivitas air. Nilai aktivitas air pada sampel kontrol dan osmosis setelah freeze drying tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Aktivitas air setelah freeze-drying pada sampel kontrol adalah 0,155 dan pada perlakuan osmosis adalah 0,161. Hal ini dapat dikarenakan perlakuan osmosis tidak menurunkan a_w secara signifikan, karena penurunan kadar air selama perlakuan osmosis pada penelitian ini hanya sebesar 13%, sehingga penurunan a_w juga



diperkirakan rendah, seperti pada penelitian Kong (2017), setelah dehidrasi osmosis menggunakan larutan sukrosa 60° Brix selama 29 jam pada suhu 50°C, a_w mangga kotak (1,2×1,2×1,2 cm) hanya berkurang 0,09 dari 0,98 menjadi 0,9. Pada penelitian Assis *et al.* (2018), walaupun kadar air berkurang menjadi 80%, setelah dehidrasi osmosis menggunakan larutan sukrosa 16,6±0,8° Brix selama 6 jam pada suhu 60°C, a_w apel kotak (1,2×1,2×1,2 cm) hanya berkurang 0,055 dari 0,990 menjadi 0,935. Namun, pada proses freeze-drying, a_w dapat berkurang dengan signifikan karena berkurangnya kadar air, pada sampel apel yang diuji a_w menjadi 0,3.

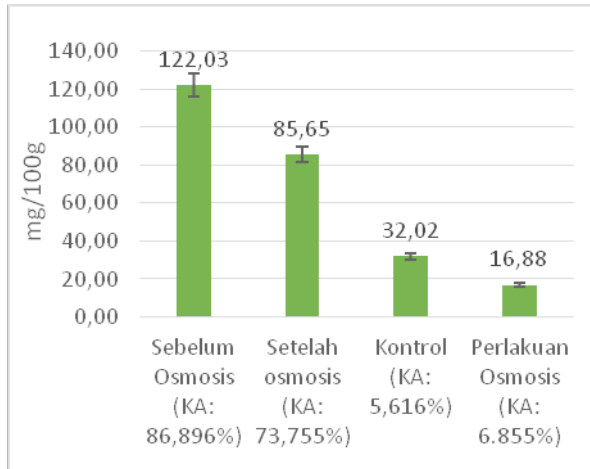
Total Bakteri setelah Freeze-Drying

Tabel 5. Total Bakteri setelah *Freeze-Drying*

Pengenceran	Kontrol	Perlakuan Dehidrasi Osmosis
10 ⁻⁵	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
10 ⁻⁴		
10 ⁻³		

Analisis total bakteri sampel kontrol dan perlakuan osmodehidrasi tidak menunjukkan perbedaan. Sampel memenuhi standar mikrobiologi buah kering BPOM (2016), karena pada kedua sampel tidak terdeteksi adanya cemaran bakteri setelah pengamatan selama 24 jam hal ini dapat dikarenakan setelah freeze-drying, sampel mempunyai nilai a_w yang sangat rendah yaitu 0,16 dan 0,15, sementara nilai ideal a_w untuk pertumbuhan bakteri adalah 0,8-0,9. Akibat rendahnya nilai a_w ini, sel-sel bakteri mengalami kerusakan DNA dan RNA, denaturasi protein, kerusakan dinding sel, dan perubahan membran sitoplasma. Pada proses pengeringan juga dapat menyebabkan kenaikan konsentrasi senyawa toksik dan asam pada sel, serta adanya reaksi oksidasi yang terjadi. Selain itu, pada proses freeze-drying juga mempengaruhi inaktivasi bakteri dan terbentuknya kristal air yang besar selama proses freeze-drying dapat menyebabkan rusaknya sel membran, sehingga menurunkan kelangsungan hidup sel bakteri (Bourdoux, 2016).

Vitamin C setelah Freeze-Drying



Gambar 8. Kadar Vitamin C sampel

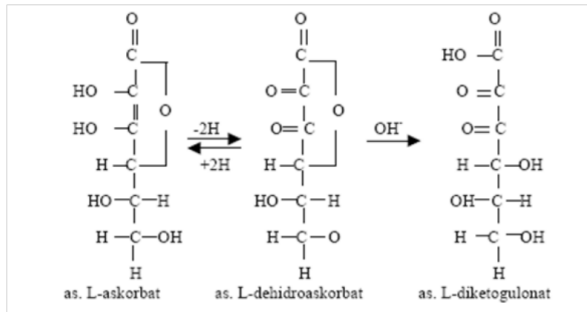
Umumnya kadar vitamin C pada pepaya segar adalah 46 mg (Cresna dan Ratman, 2014) sampai 78 mg (Suyanti *et al.*, 2012) per 100 g sampel. Kadar vitamin C awal pepaya berbeda-beda karena vitamin C pada pepaya dipengaruhi banyak faktor, seperti tingkat kematangan, varietas, iklim, temperatur, jumlah pupuk nitrogen yang digunakan, serta kondisi lingkungan penyimpanan dan distribusi buah juga dapat mempengaruhi kadar vitamin C. Analisis vitamin C dengan metode yang berbeda-beda menyebabkan adanya perbedaan hasil perhitungan (Bekele dan Geleta, 2015).

Kadar vitamin C sampel pepaya freeze-dried tanpa perlakuan (kontrol) dan dengan perlakuan awal osmosis mempunyai perbedaan yang nyata. Pada sampel kontrol kadar vitamin C 31,7mg/100g bahan dengan kadar air 5,626% dan pada sampel dengan perlakuan optimum osmosis mengandung vitamin C sebesar 16,88 mg/100g bahan dengan kadar air 6,855. Hal ini dapat disebabkan oleh asam askorbat dan garam natriumnya yang tidak stabil dikarenakan air, oksigen, panas, atau terdapat bahan



pengoksidasi lainnya, dapat dilihat bahwa setelah proses dehidrasi osmosis kadar vitamin C pepaya menurun signifikan. Seperti pada penelitian Pertiwi dan Susanto (2014), pada saat proses osmosis, penambahan gula menyebabkan terekstraknya air, keluarnya air dari sampel ini juga dapat menyebabkan larutnya komponen larut air seperti vitamin C. Selain itu, lamanya waktu osmosis juga menyebabkan reaksi oksidasi vitamin C terjadi lebih lama, sehingga vitamin C teroksidasi menjadi asam L-dehidroaskorbat, dan berubah lagi menjadi asam L-diketogulonat yang tidak mempunyai keaktifan vitamin C. Vitamin C dapat rusak dari dikarenakan faktor luar seperti suhu, kadar air, oksigen, dan katalisator logam.

Pada penelitian Shofian *et al.* (2011) dengan kadar air awal pepaya segar yang tidak jauh berbeda, menunjukkan bahwa vitamin C setelah freeze drying tanpa perlakuan osmosis adalah $16.84 \pm 2.31 \text{ mg}/100\text{g}$ dengan kadar vitamin C pada pepaya segar yang lebih rendah yaitu $16.57 \pm 0.36 \text{ mg}/100\text{g}$, perbedaan penurunan kadar vitamin C hal ini dapat dikarenakan osmosis mengurangi vitamin C karena vitamin C ikut larut kedalam air dan dikarenakan kematangan buah yang berbeda. Kadar vitamin C awal pepaya berbeda-beda karena vitamin C pada pepaya dipengaruhi banyak faktor, seperti tingkat kematangan, varietas, iklim, temperatur, jumlah pupuk nitrogen yang digunakan, serta kondisi lingkungan penyimpanan dan distribusi buah juga dapat mempengaruhi kadar vitamin C. Analisis vitamin C dengan metode yang berbeda-beda menyebabkan adanya perbedaan hasil perhitungan. Sehingga kadar vitamin C awal pepaya tidak bisa disamakan dengan penelitian-penelitian sebelumnya Bekele dan Geleta (2015).



Gambar 9. Reaksi Perubahan Vitamin C
 (Winarno, 1984 dalam Cresna dan Ratman, 2014).

Kesimpulan

Pretreatment dehidrasi osmosis didapatkan respon delta kadar air (KA) dengan R² sebesar 0,8923 pada model linear dengan Persamaan $\text{KadarAir}(\Delta\%) = -4,63473 + 0,258845 \times \text{Konsentrasi} + 1,35257 \times \text{Waktu} + 0,083462 \times \text{Suhu}$. Kombinasi perlakuan optimum pretreatment dehidrasi osmosis pepaya bebas konsentrasi sebesar 30%, suhu sebesar 55°C, dan waktu 4,551 jam, variabel optimum ini ditentukan dengan berdasarkan nilai desirability terbesar (mendekati 1) yaitu 0,542. Freeze-drying skala industri 14 jam menghasilkan sampel pepaya dengan KA, AW, Total Bakteri tidak menunjukkan pengaruh signifikan, dan kadar vitamin C yang menunjukkan penurunan signifikan dibandingkan kontrol.

Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ibu Dr. Dea Indriani Astuti, M.Si dan Ibu Dr. Isty Adhitya Purwasena selaku dosen pembimbing, dan pihak lain yang terlibat secara langsung maupun tidak langsung sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan baik.



Kontribusi penulis

SAR melakukan penelitian di laboratorium, menganalisis data, dan menulis draft publikasi. IAP dan DIA menjadi pembimbing SAR dan memberikan bantuan dana untuk penelitian. Semua penulis membaca dan mengesahkan hasil akhir draft publikasi.

References

- An, K., S. Ding, H. Tao, D. Zhao, X. Wang, Z. Wang, X. Hu. (2013). Response surface optimisation of osmotic dehydration of Chinese ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) slices. *International Journal of Food Science and Technology*, 48; 28-34
- Arya, S. S., V. Natesan, dan P.K. Vijayaraghavan. (1983). Stability of carotenoids in freeze dried pepaya (*Carica pepaya*). *Journal of Food Technology*, 18: 177-181
- Assis, F. R., R. M. S. C. d. Morais, dan A. M. M. B. d. Morais. (2018). Osmotic dehydration combined with freeze-drying of apple cubes and comparison with microwave drying and hot air drying. *Advances in Food Science and Engineering*, 2(1): 38-47
- Astria, L. Y., Bohari dan Alimuddin. (2018). Analisa kadar vitamin C pada buah anggur hijau (*Vitis vinifera* L.) dengan variasi lama penyimpanan pasca panen. *Jurnal Atomik*, 03(2): 68-72
- Bekele, D. A., dan G. S. Geleta. (2015). Iodometric determination of the ascorbic acid (vitamin C) content of some fruit consumed in Jimma Town Community in Ethiopia. *Research Journal of Chemical Sciences*, 5(1): 60-63
- Bourdoux, S., D. Li, A. Rajkovic, F. Devlieghere, dan M. Uyttendaele. (2016). Performance of drying technologies to ensure microbial safety of dried fruits and vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 15:1056-1066
- BPOM. (2016). Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 16 Tahun 2016 tentang

- Kriteria Mikrobiologi dalam Pangan Olahan. Jakarta: BPOM Republik Indonesia
- BPS. (2018). Statistik Tanaman Buah-buahan dan Sayuran Tahunan Indonesia 2017. Jakarta: Badan Pusat Statistik
- Cresna, M. N. dan Ratman. (2014). Analisis vitamin C pada buah pepaya, sirsak, srikaya, dan langsung yang tumbuh di Kabupaten Donggala. *J. Akad. Kim*, 3(3); 58-65
- Evans, E. A., F. H. Ballen, dan J. H. Crane. (2018). An overview of US papaya production, trade, and consumption. *Food and Resource Economics Department IFAS Extension*, 914: 1-8
- Hermawan, R. (2015). Pengaruh suhu dan konsentrasi larutan gula pada proses dehidrasi osmosis buah pepaya (*Carica papaya*, L). Skripsi. Bandar Lampung: Universitas Lampung
- Kong, L. (2017). Mass transfer and ascorbic acids degradation during osmotic dehydration of ripe mango (*Mangifera indica* L.). Research. Wageningen: Wageningen University and Research
- Kristyaningsih, M. F. O. (2017). Karakteristik fisik, kimiawi, dan mikrobiologis daging itik yang dimarinasi dengan ekstrak daun kunyit (*Curcuma domestica* Val). Skripsi. Semarang: Universitas Diponegoro
- Leviana, W., dan V. Paramita. (2017). Pengaruh suhu terhadap kadar air dan aktivitas air dalam bahan pada kunyit (*Curcuma longa*) dengan alat pengering electrical oven. *METANA*, 13(2); 37-44
- Luketsi, W. D., dan L. P. E. Nugroho. (2011). Pengaruh perlakuan bahan pengisi kemasan terhadap mutu fisik buah pepaya varietas IPB 9 (*Callina*) selama transportasi. Skripsi, Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Magdalena, A., S. Waluyo, C. Sugianti. (2014). Pengaruh suhu dan konsentrasi larutan gula terhadap dehidrasi osmosis buah waluh (*Cucurbita moschata*). *Jurnal rekayasa Pangan dan Pertanian*, 2(4): 1-8
- Pertiwi, M. F. D. dan W. H. Susanto. (2014). Pengaruh proporsi (buah:sukrosa) dan lama osmosis terhadap kualitas sari buah



stroberi (*Fragaria Vesca L.*). Jurnal Pangan dan Agroindustri, 2(2): 82-90

Pujasari, G. (2012). Penentuan titik kritis pascapanen pepaya *Carica papaya L.* (Studi Kasus di sentra produksi pepaya di Kabupaten Sukabumi, Banyumas, Kebumen, dan Boyolali). Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor

Shofian, N. M., A. A. Hamid, A. Osman, N. Saari, F. Anwar, M. S. P. De, dan M. R. Hairuddin. (2011). Effect of freeze-drying on the antioxidant compounds and antioxidant activity of selected tropical fruits. *International Journal of Molecular Science*, 12: 4678-4692

Susanti, R. F., J. R. Witono, dan P. Cakasana. (2016). Studi pengolahan buah pepaya menjadi fruit leather dan manisan pepaya bernutrisi tinggi. Research Report. Bandung: Universitas Katolik Parahyangan

Suyanti, Setyadjit, dan A. B. Arif. (2012) Produk diversifikasi olahan untuk meningkatkan nilai tambah dan mendukung pengembangan buah pepaya (*Carica papaya L.*) Indonesia. *Buletin Teknologi Pascapanen Pertanian*, 8(2): 1-9

Wirawan, S. K., dan N. Anasta. (2013). Analisis permeasi air pada dehidrasi osmosis pepaya (*Carica papaya*). *Agritech*, 33(3): 303-310

Yudistira, K. (2013). Optimasi dehidrasi osmotik irisan buah pepaya (*Carica papaya L.*) menggunakan response surface methodology (RSM) Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor

Yuliana. (2012). Karakteristik dehidrasi osmotik irisan mangga cengkir (*Mangifera indica L.*) pada berbagai ketebalan dan konsentrasi larutan gula. Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor

Tingkat Ekspresi Gen gag-CA Virus Penyakit Jembrana dengan Sistem Penghantaran Kompleks Polylactic-Co-Glycolic Acid (PLGA) sebagai Kandidat Vaksin DNA

Stephanie Elcia S.P^{1*}, Asmarani Kusumawati²

¹Pusat Penelitian Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada,
Yogyakarta, 55281, Indonesia

²Department Reproduksi dan Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan,
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 55281, Indonesia

Abstrak. Sapi Bali merupakan sapi lokal yang berperan dalam pemenuhan kebutuhan daging sapi di Indonesia. Namun, ketersediaan sapi Bali terkendala penyakit yang disebabkan oleh Virus Penyakit Jembrana (VPJ). Saat ini, vaksin tersedia secara komersial adalah JDVacc yang dapat menginduksi sistem kekebalan tubuh sapi dengan perlindungan hanya sampai 70%, oleh karena itu diperlukan pencegahan yang lebih efektif, seperti penggunaan vaksin DNA. Optimasi penghantaran vaksin DNA merupakan faktor penting terhadap keberhasilan DNA masuk ke dalam membran sel. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat ekspresi mRNA gag-ca dengan penghantar Polylactic-Co-Glycolic Acid (PLGA). Metode yang digunakan dalam pembentukan kompleks PLGA-DNA yaitu *double-emulsion*. Kompleks ditransfeksikan ke sel HeLa dan dianalisa tingkat ekspresinya menggunakan Real Time PCR. Kemudian partikel dikarakterisasi dengan mengukur zeta potensial dan distribusi ukuran partikel. Formulasi terbaik yaitu PVA_(2%) PLGA_(5%)-DNA_(1.0%) dengan nilai 50.45. Hasil pengukuran potensial zeta PLGA yaitu -40.0 mV. Ukuran kompleks PLGA-DNA yaitu 312 nm. Kesimpulan polimer PLGA mampu menghantarkan DNA, dengan tingkat ekspresi dan tingkat kestabilan dari kompleks nanopartikel yang baik.

Kata kunci: *Virus Penyakit Jembrana, Gen gag-Ca, Vaksin DNA, Polylactic-Co-Glycolic Acid (PLGA); sel HeLa,*



Pendahuluan

Sapi Bali adalah sapi potong, yang merupakan bagian terpenting dari sapi asli Indonesia dan sekarang tersebar di 34 provinsi. Beberapa keunggulan sapi Bali termasuk kesuburan yang sangat tinggi dan daging subkutan rendah lemak. Sapi Bali adalah salah satu jenis sapi potong utama sehingga berperan dalam pengembangan industri ternak di Indonesia (Direktur Kesehatan Hewan, 2015). Upaya peningkatan populasi sapi Bali di Indonesia terhambat oleh penyakit menular yang disebut penyakit Jembrana, yang secara khusus hanya menyerang sapi Bali, di mana infeksi bisa menjadi salah satu penyebab turunnya kesuburan sapi Bali (Kusumawati, 2014).

Penyakit Jembrana adalah penyakit hewan menular pada sapi Bali yang disebabkan oleh virus Retroviridae, subfamili Lentivirinae (virus yang menyebabkan penurunan daya tahan) (Kertayadnya *et al.*, 1993). Kerugian ekonomi yang ditimbulkan selama wabah Virus Penyakit Jembrana (VPJ) cukup signifikan karena angka sakit dan kematian relatif tinggi. Selain itu, VPJ dapat menyerang sistem kekebalan tubuh, sehingga hewan rentan terhadap penyakit lain. Infeksi dari VPJ diobati dengan vaksin limpa sapi yang dibuat dari limpa diemulsi dengan adjuvan, VPJ diambil dari limpa hewan yang terinfeksi. Kelemahan dari vaksin limpa yaitu membutuhkan donor sapi sehat sehingga produksi vaksin masih minimal, selain itu keamanan vaksin masih tidak terjamin karena kemungkinan infeksi yang lainnya ikut terbawa (Hartaningsih *et al.*, 2001). Terkait dengan ini, para ahli mengembangkan vaksin yang lebih aman dan bisa diproduksi dalam skala besar yaitu melalui bioteknologi rekombinan yang disebut vaksin DNA (Xu *et al.*, 2011).

Vaksin DNA adalah vaksin yang dibuat dengan memasukkan DNA atau gen yang mengkode protein imunogenik ke dalam vektor ekspresi eukariotik. Salah satu gen struktural JDV yang digunakan sebagai sumber vaksin DNA adalah gen gag subunit (gag-CA) (Wibawa *et al.*, 2006). Gen gag-CA adalah gen penyandi protein utama (Kertayadnya *et al.*, 1993) dan gen imunodominan pada sapi yang terinfeksi dengan VPJ. Vaksin DNA membutuhkan

sistem pengiriman untuk mencapai target. Sistem pengiriman berbasis polimer sering digunakan sebagai karir produktif untuk pengiriman obat atau DNA dalam terapi gen. Salah satu polimer yang biodegradable dan biokompatibel adalah asam Polylactic-co-glikolat (PLGA), hidrolisisnya mengarah pada monomer metabolik, asam laktat, dan asam glikolat. Karena kedua monomer ini bersifat endogen dan cepat dimetabolisme oleh tubuh melalui siklus Krebs, toksisitas sistemik minimal dikaitkan dengan penggunaan PLGA untuk pemberian obat atau aplikasi biomaterial (Danhier *et al.*, 2012). Penelitian ini akan mengamati kemampuan PLGA untuk menghantarkan DNA dilihat dari nilai ekspresi mRNA.

Material dan Metode

Produksi pEGFP-C1-gag-CA VPJ

Hasil optimasi plasmid ditransformasikan ke dalam bakteri *Escherichia coli* DH5 α dan kemudian ditumbuhkan dalam 200 mL Luria Bertani Broth yang mengandung 50 μ g / mL kanamycin pada 37°C selama maksimum 16 jam dengan penggojogan 150-180 rpm. Kultur dipanen dengan menggunakan Kit Maxi Ekstraksi Plasmid FavorPrepTM dan dilakukan sesuai dengan manual Favorgen.

Pembuatan Kompleks PLGA dengan Metode *Double Emulsion*

Stok larutan 5% PLGA diencerkan dengan diklorometana (DCM). PLGA terlarut dalam DCM adalah fase minyak, sedangkan solusi pEGFP-C1-gag-CA VPJ adalah fase endo-air. Perbandingan rasio DNA: PLGA (wt/wt) yaitu 0.5%, 1.0%, dan 1.5%. Solusi DNA ditambahkan 50 μ l larutan PLGA dan diemulsi menggunakan sonikator selama 10 detik, membentuk emulsi primer (w/o). Selanjutnya, emulsi air dalam minyak diperoleh dicampur dengan 200 μ l PVA larutan dua persen atau satu persen, dalam pusaran 7500 rpm (emulsi sekunder) (w/o/w). Emulsi sekunder dimasukkan ke dalam gelas berisi NFW dan secara magnetik diaduk pada 200 rpm selama lima jam. Kemudian pelarut organik diuapkan pada suhu kamar dan disentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit. Kompleks yang terbentuk dicuci dengan air steril tiga kali dan dikering-bekukan.



Pembuatan Kompleks NL

Kompleks NL-DNA dibuat menggunakan reagen Transfeksi Transfeksi EL (Transbionovo) TransltoTM, dan dibuat sesuai dengan manual Transbionovo sebagai berikut. Sebanyak 8 µg DNA plasmid diencerkan dalam 500 µl NFW (pembuatan kompleks) atau DMEM (pada saat transfeksi ke sel HeLa). TransltoTM EL Transfection Reagent menambahkan 1.68 µl ke dalam campuran. Campuran DNA dan NL diinkubasi selama 15-20 menit pada suhu kamar. NL-DNA siap digunakan dan dapat ditransfusikan dalam 1 mL media kultur sel yang telah ditumbuhkan oleh sel HeLa.

Gel retardation assay

Proses enkapsulasi atau keberhasilan pembentukan kompleks polimer-DNA diuji menggunakan metode uji gel retardation assay

Uji Sitotoksik

Pengujian sitotoksitas semua komponen agen pengiriman vaksin dilakukan dengan uji MTT. Komponen yang diuji adalah pEGFP-C1-gag-CA VPJ (8 µg per 3 mL), PLGA (16 µg per 3 mL), larutan NL (tanpa menambahkan DNA), kompleks PLGA-DNA (8 µg DNA + 16 µg PLGA per 3 mL). Sel HeLa dipapar pada komponen yang ingin diuji selama empat jam (sesuai dengan waktu transfeksi), kemudian diganti dengan medium baru, dan dilanjutkan dengan inkubasi selama 24 jam. Setiap sampel diuji dalam sumur yang berbeda sebagai tes replikasi. Pengujian pengujian MTT dilakukan menggunakan layanan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM

Transfeksi Sel HeLa (*In Vitro*)

Stock media kultur 50 mL terdiri dari Fetal Bovine Serum (FBS) sejumlah 5 mL, Penstrep sejumlah 1 mL, Fungizone sejumlah 250 µl, dan DMEM secukupnya. Sel HeLa yang sudah confluent 70-80% pada tissue culture disk (diameter 10 cm) dengan densitas 7.5×10^6 per 10 mL DMEM. HeLa kemudian di pipet 1 mL, dikultur pada 12 petri dish steril berdiameter 60 mm yang

diberikan *cover slip* pada bagian tengahnya dengan diameter 22 mm dengan densitas sel setiap cawan petri mengandung 7.5×10^5 sel. Inkubasi pada 5% CO₂ dan suhu 37°C, *overnight* (hingga sel menempel pada petri). Kemudian sel HeLa ditransfeksi sebanyak 8 µg dengan perlakuan sebagai berikut: HeLa atau PBS saja (kontrol negatif); Transfeksi hanya DNA saja; Transfeksi hanya menggunakan PLGA saja; Transfeksi menggunakan kompleks NL-DNA (kontrol positif); Transfeksi kompleks PLGA-DNA.

Deteksi Kuantitatif mRNA Gen Target pada Sel HeLa

Reagen yang digunakan adalah TransStart® Tip Green qPCR SuperMix (Transbionovo). Program *real time*-PCR dijalankan dengan predenaturasi 94°C selama 30 detik, denaturasi 94 °C selama 5 detik, annealing dan elongasi 60 °C selama 30 detik. Siklus denaturasi, annealing dan elongasi dilakukan sebanyak 40 kali dan dilakukan *plate reading* pada akhir setiap siklus. Pembuatan *melting curve* dilakukan dengan pemanasan selama 5 detik dari suhu 60 °C hingga 95°C dengan interval 0.5 °C. Stok awal pEGFP-C1-gag-CA digunakan sebagai kontrol positif. Gen GAPDH manusia digunakan sebagai kontrol internal.

Penentuan Ukuran Partikel dan Zeta Potensial

Pengukuran distribusi ukuran partikel PLGA-DNA kompleks yang telah lulus tes penjeratan diukur menggunakan Mastersizer dengan prinsip hamburan cahaya laser. Pengukuran diuji di Yayasan Profesor Nidom, Surabaya. Pengukuran potensi Zeta menggunakan Zetasizer dilakukan oleh Laboratorium Penelitian Terpadu, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada, DIY.

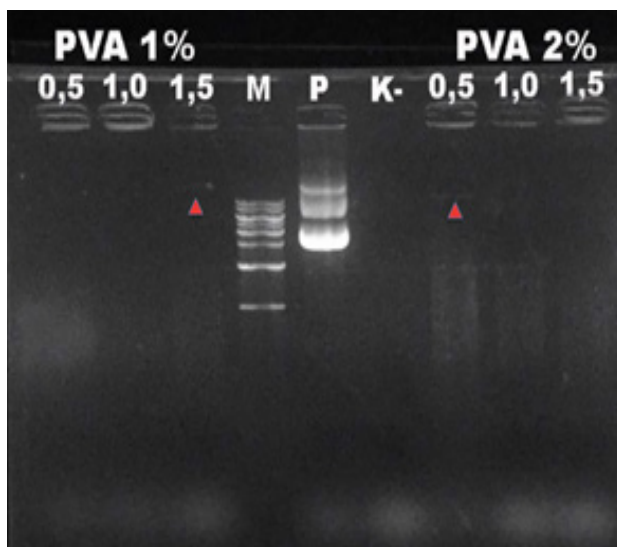
Hasil dan Diskusi

Produksi pEGFP-C1-gag-CA VPJ

Plasmid DNA yang telah diproduksi dan diisolasi kemudian diukur dengan nanodrop. Hasil isolasi plasmid DNA digunakan untuk pembentukan kompleks PLGA.

Gel retardation assay

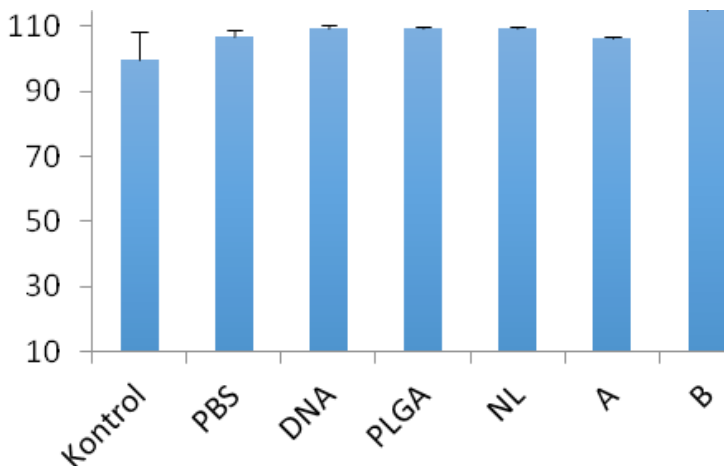
Kompleks PLGA-DNA dengan beberapa konsentrasi dipilih dengan metode pengujian *gel retardation assay*. Formulasi penjeratan kompleks yang baik sangat menentukan dalam keberhasilan polimer menghantarkan DNA ke dalam membran sel. Penjeratan kompleks PLGA-DNA ditunjukkan pada Gambar 1. Pembentukan kompleks yang baik terlihat dari DNA yang terjatuh dalam sumuran gel agarosa. Jika formulasi kompleks tidak terbentuk dengan baik, DNA akan terlihat terlepas dan bermigrasi pada gel agarosa. Pada tanda merah terlihat DNA yang bermigrasi pada gel agarose, hal ini menunjukkan pembentukan kompleks yang kurang baik pada formulasi $\text{PVA}_{(1\%)} \text{PLGA}_{(5\%)} \text{-DNA}_{(1.5\%)}$ dan $\text{PVA}_{(2\%)} \text{PLGA}_{(5\%)} \text{-DNA}_{(0.5\%)}$. Formulasi yang dipilih untuk pengujian selanjutnya ditentukan berdasarkan konsentrasi DNA terkecil yaitu $\text{PVA}_{(1\%)} \text{PLGA}_{(5\%)} \text{-DNA}_{(0.5\%)}$ (A) dan $\text{PVA}_{(2\%)} \text{PLGA}_{(5\%)} \text{-DNA}_{(1.0\%)}$ (B).



Gambar 1. Seleksi penjeratan kompleks $\text{PLGA}_{(5\%)} \text{-DNA}$ pada gel agarose. PLGA sebagai kontrol negatif (K-), plasmid DNA (P), DNA marker 1 kb Universal Gene (M).

Uji Sitotoksik

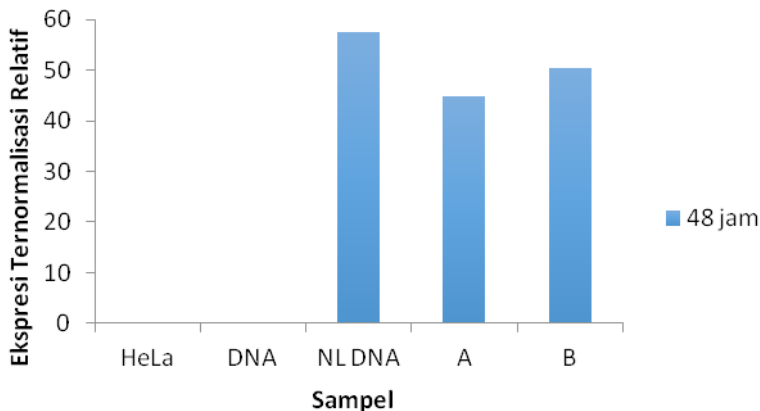
Pengujian sitotoksik dilakukan sebelum kompleks ditransfusikan menjadi sel HeLa. Kompleks PLGA-DNA dipastikan tidak beracun, dengan viabilitas sel 100% ditunjukkan pada Gambar 2. Pengujian sitotoksik adalah model pada tingkat *in vitro*, sehingga diharapkan bahwa pengiriman dengan PLGA atau kitosan tidak membahayakan sel itu sendiri. Hasil uji sitotoksik menunjukkan kompleks tidak bersifat toksik pada sel HeLa dengan tingkat viabilitas sel rata-rata diatas 90 %.



Gambar 2. Uji Viabilitas Sel HeLa dengan perlakuan kompleks PLGA-DNA

Deteksi Kuantitatif Gen Target pada Sel HeLa

Gambar 3 menunjukkan ekspresi gen gag-CA mRNA kompleks PLGA-DNA pada 48 jam. Berdasarkan hasil kuantifikasi normalisasi ekspresi dengan inkubasi 48 jam, nilai ekspresi mRNA tertinggi adalah sampel $PVA_{(2\%)} PLGA_{(5\%)}-DNA_{(1.0\%)}$ (B) yaitu 50.45. Jika dibandingkan dengan hasil kontrol positif NL DNA, hasil ekspresi mRNA sampel B bisa dikatakan baik. NL sendiri merupakan jenis non-liposom komersial yang sudah teruji kemampuan penghantarannya.



Gambar. 3. Ekspresi mRNA Ternormalisasi

Penentuan Ukuran dan Zeta Potensial

Pengukuran NL DNA, ketika dilihat pada Tabel 1, populasi partikel didominasi oleh partikel berukuran 36.9 nm. Nilai potensial zeta dari kompleks NL-DNA adalah 19.9 mV. Menurut Wang *et al.*, (2010) ukuran optimal dalam penyerapan seluler nanopartikel yaitu 30-50 nm, hasil pengukuran ukuran kompleks NL berada pada kisaran nilai optimal penyerapan seluler. Untuk hasil zeta potensial kompleks NL menunjukkan muatan positif pada kompleks NL-DNA yang akan membuatnya lebih mudah bagi partikel untuk menempel pada membran sel. Dari hasil karakterisasi partikel sejalan dengan hasil ekspresi mRNA kompleks NL dengan nilai ekspresi tertinggi atau sebagai kontrol positif penghantar komersial.

Untuk penentuan ukuran dan zeta potensial kompleks PLGA-DNA, sampel yang digunakan yaitu sampel B dengan nilai ekspresi mRNA lebih tinggi dibandingkan sampel A. Nilai ditunjukkan pada Tabel 1 populasi partikel didominasi oleh ukuran partikel 312 nm. Menurut He *et al.*, (2010), ukuran partikel yang lebih besar dari 150 nm akan membutuhkan waktu pembungkusan membran, kekuatan penggerak yang lebih kuat, dan energi tambahan dalam proses internalisasi seluler. Parameter lainnya adalah potensial zeta, dimana muatan permukaan

partikel dan nilai potensial zeta menjadi salah satu faktor penting dalam penyerapan intraseluler. Hasil pengukuran potensial zeta kompleks plasmid PLGA-DNA, yaitu -40,0 mV. Pada permukaan partikel yang bermuatan negatif daya serapan sel akan lebih rendah dibandingkan dengan partikel yang bermuatan positif, namun menurut Hauck *et al.* (2008) konsekuensi penyerapan sel yang tinggi yaitu tingkat toksisitas permukaan partikel yang bermuatan positif lebih tinggi dibandingkan yang bermuatan negatif. Nilai muatan ± 30 mV menjadi acuan kestabilan kompleks partikel, nilai potensial zeta pada kompleks PLGA-DNA menunjukkan tingkat stabilitas partikel yang baik.

Untuk membuktikan tingkat kestabilan dari partikel dapat ditambahkan waktu inkubasi pada sel yang ditransfeksi atau bisa juga dengan pengujian ketahanan terhadap enzim hidrolitik (DNaseI).

Table 1. Particle Size Determination and Potential Zeta

	Mean Particle Size (nm)	Potential Zeta (mV)
PLGA-DNA	312	-40,0
NL-DNA	36.9	+19.9

Kesimpulan

Kompleks PLGA-DNA mampu mengirimkan DNA JDV pEGFP-C1-gag-CA ke dalam sel HeLa dan dapat mengekspresikan mRNA target. Formulasi terbaik untuk pengiriman DNA menggunakan polimer PLGA adalah $PVA_{(2\%)} PLGA_{(5\%)}-DNA_{(1.0\%)}$.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini didukung oleh Kemenristek Dikti.

Kontribusi Penulis

SE dan AK merancang penelitian, SE melakukan pekerjaan laboratorium, SE dan AK memvalidasi hasil data yang dianalisis, SE menulis naskah. Semua penulis membaca dan menyetujui final versi naskah.



Referensi

- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., & Pr  at, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 505–522.
- Direktur Kesehatan Hewan. (2015). Pedoman Pengendalian dan Penanggulangan Penyakit Jembrana. In *Directorate General of Livestock and Animal Health Services. Ministry of Agriculture*.
- Hartaningsih, N., Dharma, D. M. N., Soeharsono, S., & Wilcox, G. E. (2001). The induction of a protective immunity against Jembrana disease in cattle by vaccination with inactivated tissue-derived virus antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 78(2), 163–176.
- Hauck, T. S., Ghazani, A. A., & Chan, W. C. W. (2008). Assessing the effect of surface chemistry on gold nanorod uptake, toxicity, and gene expression in mammalian cells. *Small*, 4(1), 153–159.
- He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C., & Yin, C. (2010). Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*, 31(13), 3657–3666.
- Kertayadnya, G., Wilcox, G. E., Soeharsono, S., Hartaningsih, N., Coelen, R. J., Cook, R. D., ... Brownlie, J. (1993). Characteristics of a retrovirus associated with Jembrana disease in Bali cattle. *Journal of General Virology*, 74(9), 1765–1773.
- Kusumawati, A. (2014). The Structure and Function of Jembrana Disease Virus Genome. *Journal of Infection and Molecular Biology*, 2(2), 26–29.
- Wang, S. H., Lee, C. W., Chiou, A., & Wei, P. K. (2010). Size-dependent endocytosis of gold nanoparticles studied by three-dimensional mapping of plasmonic scattering images. *Journal of Nanobiotechnology*, 8, 1–13.
- Wibawa, H., Kusumawati, A., & Widada, J. S. (2006). Ekspresi dan Respon Imun Kandidat Vaksin DNA dari Gen Gag-Ca Virus Penyakit Jembrana. *Sains Dan Sibernatika*, 19(Januari), 81–101.

Xu, K., Ling, Z. Y., Sun, L., Xu, Y., Bian, C., He, Y., ... Sun, B. (2011). Broad humoral and cellular immunity elicited by a bivalent DNA vaccine encoding HA and NP genes from an H5N1 virus. *Viral Immunology*, 24(1), 45-56.



Pemilihan Lokasi Budidaya Microalga skala industri di Yogyakarta dan Jawa Tengah

Suhendra*¹, Deri Gustian²

¹ Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Indonesia

²Fakultas Pertanian, National Chung Hsing University, Taiwan

Abstrak. Budidaya dan Pengolahan Mikroalga memiliki prospek yang cerah bagi pertumbuhan industri di Indonesia. Penelitian mengenai pemilihan lokasi budidaya mikroalga untuk skala menengah hingga industri belum banyak dilakukan. Padahal, mikroalga sebagai salah satu spesies mikro memiliki kriteria tumbuh yang dipengaruhi secara geografis. Kondisi iklim tropis di Indonesia menjadi potensi yang besar untuk pengembangan budidaya mikroalga. Penelitian ini bertujuan untuk menemukan lokasi pendirian industri mikroalga berdasarkan kriteria spasial. Data spasial diolah dengan pendekatan overlay menggunakan ArcGIS. Wilayah yang menjadi objek pemilihan lokasi industri mikroalga adalah Yogyakarta dan Jawa Tengah. Hasil penelitian menunjukkan titik lokasi yang layak dan memenuhi kriteria pendirian industri mikroalga sebanyak 283 lokasi dengan luas area di atas 50 ha. Hasil pemilihan ini dapat menjadi rujukan dalam analisis lanjutan pendirian industri mikroalga di Indonesia.

Kata kunci: *Mikroalga, Spasial, Yogyakarta, Jawa Tengah*

Pendahuluan

Industri berbasis mikroalga berpotensi menjadi industri unggulan baru yang dapat mencakupi berbagai bidang seperti pangan, energi dan penanganan limbah. Sifat tumbuhnya yang cepat serta mengandung kandungan lipid, karbohidrat dan nutrisi menjadikannya dapat dimanfaatkan dalam berbagai kepentingan. Seperti bahan baku *bioethanol*, *biofuel* dan *biomethane*, serta untuk produk farmasi dan produk pangan nutrisi. Banyak penelitian telah dilakukan berhubungan dengan kultivasi atau budidayanya, siklus hidup, dan konseptualisasi *biorefinery* alga (Sigh dan Gu, 2010).

Mikroalga Sebagai makhluk hidup uni seluler memiliki sifat unik dan keragamannya 200.000-800.000 spesies yang hidup di alam. Meski uni seluler, mikroalga memiliki kinerja hamper sama dengan makhluk hidup multiseluler yang memiliki klorofil, hidup pada air tawar atau laut, memerlukan karbon dioksida, dan dapat melakukan fotosintesis dengan bantuan beberapa nutrient dan cahaya matahari. Meski demikian, strukturnya sangat sederhana tanpa akar, daun dan batang untuk berfotosintesis (Hadiyanto dan Azim, 2012).

Perkembangan industri berbasis mikroalga juga sedang bertumbuh di Indonesia. Dengan intensitas cahaya yang tinggi dan luas perairan menjadikan Indonesia sebagai negara yang potensial. Suhu optimal untuk pertumbuhan mikroalga antara 24-30° C yang sesuai untuk iklim tropis di Indonesia. Jenis alga laut mempunyai toleransi besar terhadap perubahan salinitas, dengan angka salinitas optimal untuk pertumbuhannya yaitu 20-24%. Beberapa kawasan pesisir telah dikaji untuk dimanfaatkan sebagai lokasi pengembangan mikroalga seperti kawasan Pantai Timur dan Pantai Barat Pangandaran, Jawa Barat, yang memiliki aktivitas di kawasan pantai dan umum digunakan nelayan (Khotimah, 2018).

Dasar pemilihan lokasi budidaya mikroalga disesuaikan dengan kebutuhan dan syarat hidup mikroalga. Pada produksi masal mikroalga, harus dipastikan ketersediaan karbon dioksida dan intensitas sinar matahari yang cukup. Aktivitas industri dan transportasi yang menghasilkan bahan polutan karbon cukup menjadikan kelimpahan karbon dioksida di udara. Di Indonesia, produksi mikroalga dapat dilakukan sepanjang tahun. Nutrisi yang diperlukan untuk kultivasi ini antara lain nitrogen, fosfor, zat besi, dan beberapa kasus budidaya juga diperlukan silikon (Basmal, 2008).

Kriteria lebih spesifik mengenai syarat penetapan area kultivasi mikroalga sekala besar juga dilakukan oleh Bravo-Fritz, *et al.* (2015) yang dijadikan salah satu referensi dalam penelitian ini. Penelitian ini mengolah data spasial berdasarkan kriteria yang ditetapkan menggunakan ArcGIS. Tujuan penelitian adalah untuk

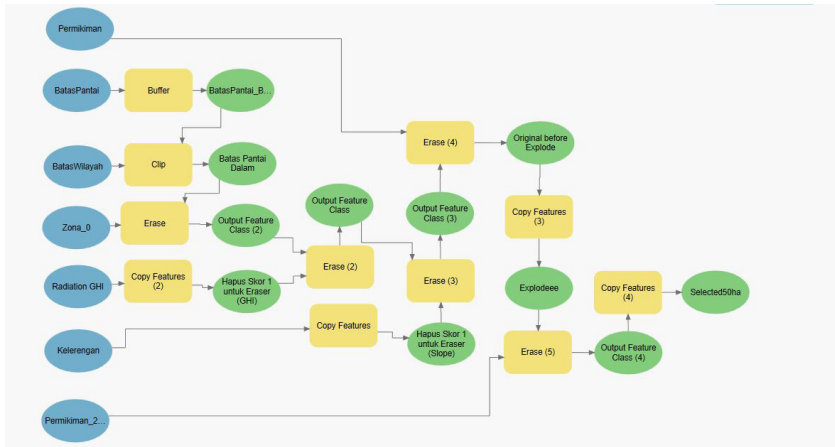


mengetahui lokasi potensial area budidaya mikroalga sekala besar di Jawa Tengah dan Yogyakarta. Hasil penelitian dapat dijadikan rujukan bagi tahapan penelitian lanjut seperti peninjauan langsung dan penetapan atribut lainnya yang berkaitan.

Metode Penelitian

Pendekatan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah pemilihan lokasi budidaya mikroalga dengan menggunakan analisis spasial. Kriteria yang digunakan merujuk dari penelitian Bravo-Fritz, *et al.* (2015) dan Menteri Perindustrian Republik Indonesia (2016) dalam Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia No. 40/M-IND/PER/6/2016. Kriteria tersebut adalah *daily solar radiation* lebih besar dari $4\text{kWh/m}^2/\text{hari}$, area dengan penyinaran lebih dari 6 jam per hari, berada dalam radius 10 km dari pantai, area yang luas dengan *slope* di bawah 5% (Bravo-Fritz, *et al.*, 2015) dan luas area minimal 50 ha (Menteri Perindustrian Republik Indonesia, 2016).

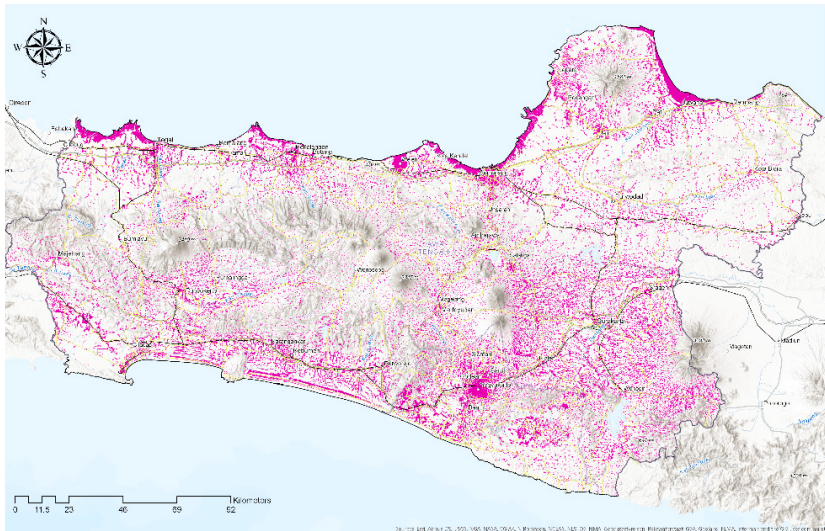
Berbagai jenis peta digunakan dalam penelitian ini sebagai data penelitian, antara lain; peta permukiman untuk wilayah Jawa Tengah dan Yogyakarta; batas pantai dan *buffering* 10 km; peta penggunaan lahan untuk tujuan khusus seperti cagar budaya, konservasi, lahan gambut, bangunan pemerintah dan area yang tidak bisa digunakan sebagai lokasi budidaya dengan skor '0'; peta lahan kosong, lahan pertanian dan area yang dapat digunakan sebagai lokasi budidaya mikroalga; peta transportasi yaitu jalan raya dan rel kereta api; peta *global horizontal irradiation* untuk area Jawa Tengah dan Yogyakarta yang diolah dari *Global Solar Atlas*; peta ke lereng dengan 2 kriteria yakni *slope* di bawah 5% dan di atas 5%. Data tersebut di olah menjadi data vektor menggunakan ArcGIS Pro 2.3.2 sebagai input data. Teknik *overlay* menggunakan *ModelBuilder* digunakan dalam penelitian ini untuk memperoleh area potensial sebagai lokasi budidaya mikroalga sekala besar. *ModelBuilder* yang dibuat dalam penelitian ini sebagai berikut:



Gambar 1. *Model Builder* yang di bangun dalam penelitian ini menggunakan ArcGIS Pro 2.3.2)

Hasil

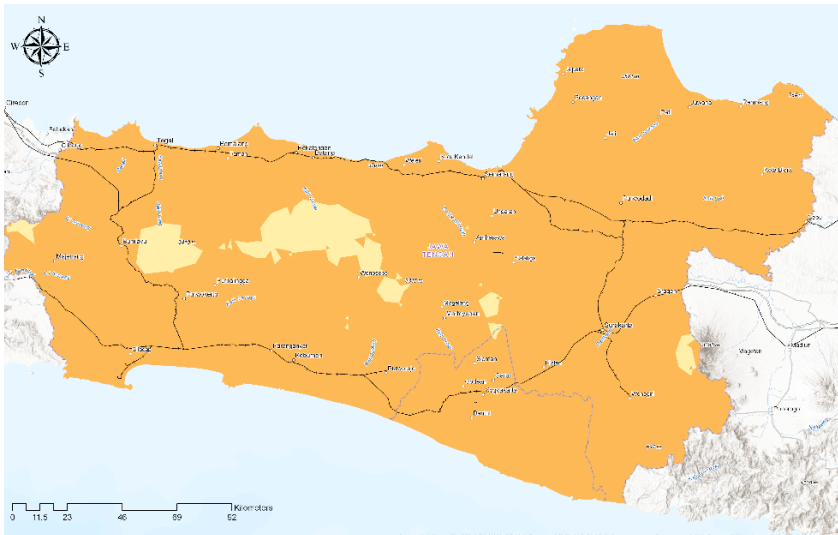
Hasil penelitian berupa lokasi terpilih yang berpotensi dimanfaatkan sebagai area budidaya mikroalga. Lokasi tersebut berjarak 250 meter dari permukiman, permukaan datar dengan di ke lerengan kurang dari 5%, dekat dengan transportasi kereta api dan jalan raya, berada dalam radius 10 km dari pantai dan cukup mendapatkan sinar matahari, dan luas minimal 50 ha. Tampilan peta permukiman, indeks radiasi, dan ke lerengan ditampilkan pada gambar 2, 3 dan 4.



Gambar 2. Peta permukiman Jawa Tengah dan Yogyakarta (di olah dari Geoportal Provinsi Jawa Tengah dan Geoportal Daerah Istimewa Yogyakarta)

Sebaran area permukiman perkotaan dan perdesaan ditandai dengan *polygon* berwarna merah muda. Gambar 2 menunjukkan area persebaran di Jawa Tengah dan Yogyakarta. Gambar juga menunjukkan dominasi aktivitas masyarakat berdasarkan pemilihan tempat tinggalnya. Aktivitas lebih padat di daerah perkotaan dan di dataran yang lebih rendah. Peta permukiman digunakan untuk menjadi pertimbangan keberadaan area aktivitas industri yang berpotensi menjadi masalah bagi masyarakat. Dalam banyak kebijakan, area kultivasi dan industri terletak jauh dari permukiman. Pemerintah melalui Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia No. 40/M-IND/PER/6/2016 menetapkan jarak minimal 2 km dengan permukiman bagi industri besar dan memperhatikan dampak sosial yang terjadi dengan adanya aktivitas industri. Pada studi pemilihan lokasi kultivasi mikroalga ini, jarak yang ditetapkan dari permukiman adalah 250 meter dan faktor kegunaan lahan secara spesifik, baik aktivitas pertanian produktif atau lahan kosong, diabaikan dalam penelitian ini.

Kriteria lain dari pemilihan lokasi kultivasi mikroalga adalah rata-rata radiasi dalam satu wilayah. Nilai optimal untuk pertumbuhan mikroalga harus lebih dari $4\text{kWh}/\text{m}^2/\text{hari}$. Area dengan nilai di bawah itu tidak dapat dimanfaatkan sebagai lokasi kultivasi mikroalga karena akan mempengaruhi tingkat pertumbuhan mikroalga. Peta *Global horizontal irradiation* Jawa Tengah dan Yogyakarta ditunjukkan dalam gambar 3.

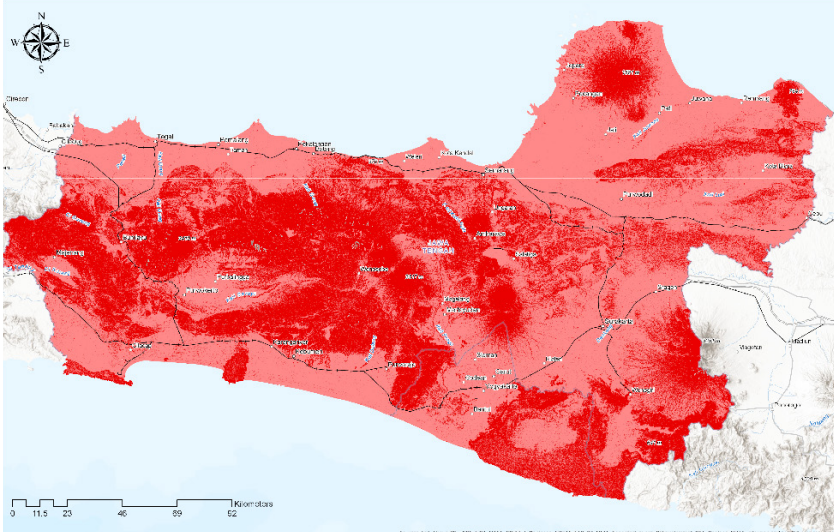


Gambar 3. Peta *Global horizontal irradiation* wilayah Jawa Tengah dan Yogyakarta (di olah dari *solar irradiation and PV power potential in Indonesia* dalam *Global Solar Atlas*)

Pada gambar 3, warna oranye menunjukkan pola dan luasan area yang layak untuk dijadikan lokasi kultivasi mikroalga dengan GHI di atas $4\text{kWh}/\text{m}^2/\text{hari}$. Area tersebut hampir tersebar secara merata di Jawa Tengah dan Yogyakarta. Area dataran tinggi seperti pegunungan umumnya memiliki GHI di bawah $4\text{kWh}/\text{m}^2/\text{hari}$ yang dalam gambar 3 di tunjukan dengan warna kuning. Meninjau hal tersebut, secara umum potensi tumbuh mikroalga di Jawa Tengah dan Yogyakarta berdasarkan radiasi matahari terbilang potensial.



Faktor lain yang menjadi pertimbangan dalam penentuan area kultivasi adalah ke lerengan lahan atau *slope*. Syarat pendirian area kultivasi adalah ke lerengan dengan nilai di bawah 5%. Persebaran nilai ini ditunjukkan da;a hasil olahan data yang ditunjukkan pada gambar 4.



Gambar 4. *Slope* wilayah Jawa Tengah dan Yogyakarta (di olah dari USGS *Earth Explorer*)

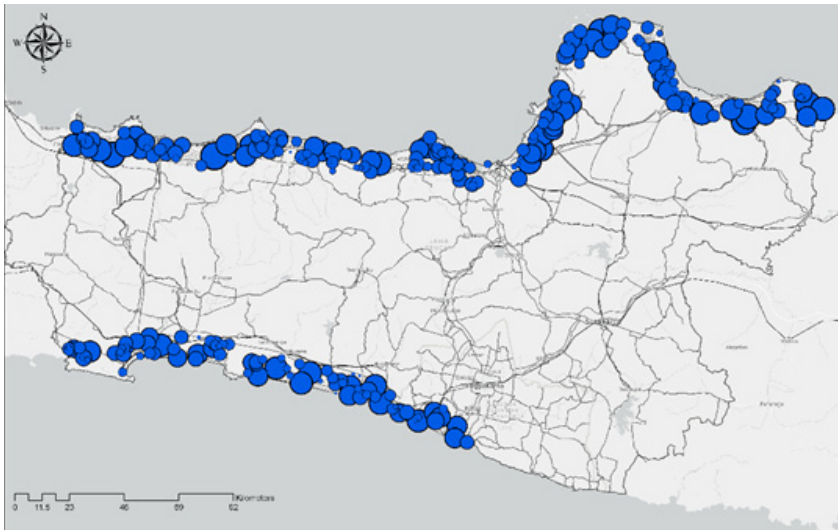
Ke lerengan dengan nilai di bawah 5% ditunjukkan dengan warna merah muda pada gambar 4. Warna merah tua menunjukkan area dengan ke lerengan di atas 5%. Dari gambar 4 terlihat area pesisir Jawa Tengah memiliki lebih banyak area dengan *slope* di bawah 5%. Area ke lerengan di atas 5% adalah area perbukitan dan pegunungan.

Karena lokasi kultivasi harus berada dalam radius 10 km dari pesisir pantai, maka luas bentang pesisir Jawa Tengah yang lebih Panjang dan nilai ke lerengan yang lebih sesuai, menjadikan potensi Jawa Tengah lebih tinggi dari Yogyakarta. Pada tahapan penelitian dengan mengolah data spasial, area dengan radius

lebih dari 10 km meskipun memiliki kriteria radiasi dan ke lerengan yang sesuai, akan tetap dianggap bernilai nol.

Dengan menggunakan teknik penskoran pada *overlay* dari semua peta yang di jadikan sebagai input data, diperoleh lokasi yang paling sesuai untuk rekomendasi area budidaya mikroalga sekala besar. Hasil analisis menunjukkan sebanyak 283 lokasi dengan luas di atas 50 ha terpilih dalam penelitian ini. Tiga lokasi dengan luas terbesar adalah 9653.52 ha di Wanasari Tegal, kemudian 4516.59 ha di Rembang dan 4379.68 ha di Pemalang. Berikut tampilan hasil analisis spasialnya.

Node persebaran lokasi berdasarkan luas tertinggi ditampilkan pada gambar 5.



Gambar 5. Hasil pengolahan peta pemilihan lokasi budidaya mikroalga wilayah Jawa Tengah dan Yogyakarta berdasarkan luasan tersedia ditunjukkan dengan ukuran *node circle*

Besar ukuran lingkaran berwarna biru menunjukkan luasan area terpilih. Semakin besar diameter lingkaran menunjukkan semakin luas pula area terpilih. Gambar juga menunjukkan pola persebaran area yang di dominasi di pesisir Jawa Tengah. Secara



lebih rinci, area terpilih ditunjukkan dalam gambar 6 dan warna merah menunjukkan area lebih luas.



Gambar 6. Hasil pengolahan peta pemilihan lokasi budidaya mikroalga wilayah Jawa Tengah dan Yogyakarta

Area dengan gradasi warna merah adalah area dengan luas area tertinggi. Kemudian dilanjutkan dengan warna kuning dan warna hijau. Pola ini dibentuk dari *overlay erase* berdasarkan area khusus yang tidak dapat dijadikan aktivitas industri dan jarak dari permukiman.

Ditinjau dari pembagian sebaran lokasi terpilih untuk area kultivasi mikroalga, Yogyakarta memiliki lebih sedikit pilihan area dengan luas yang lebih kecil. Sementara hampir seluruh area pesisir Jawa Tengah berpotensi sebagai area kultivasi. Perbandingan antara sisi utara dan selatan pun tampak nyata, di mana sebaran area dengan ketersediaan lahan yang lebih luas tersedia lebih banyak di area utara. Faktor lain seperti ketersediaan cahaya matahari, ke lerengan dan radiasi merata untuk seluruh area yang pesisir Jawa Tengah dan Yogyakarta. Sehingga ditinjau

dari kondisi iklimnya dengan kriteria yang digunakan sebagai atribut dalam penelitian ini, layak untuk menjadi lokasi kultivasi.

Aspek lain seperti pertumbuhan pemukiman menjadi faktor yang diabaikan dalam penelitian ini. Data permukiman diambil dari badan geospasial setempat yang tertaut dengan waktu ketika digitasi dilakukan. Perubahan beberapa area menjadi area wisata baru yang belum didata juga menjadi kendala sendiri, serta alih fungsi lahan yang berpengaruh pada akurasi data spasial yang dihasilkan. Memastikan lokasi secara langsung setelah menghitung kelayakan secara lokasi menggunakan analisis spasial, akan berguna untuk memastikan dan membuat analisis lain seputar lingkungan dan sosial serta ekonomi daerah setempat.

Diskusi

Pendirian lokasi budidaya mikroalga lebih jauh harus memperhatikan faktor lain selain dari kriteria tumbuh mikroalga itu sendiri. Hasil penelitian Milbrandt dan Jarvis (2010) di India menempatkan area non pertanian produktif sebagai lokasi pendirian sentra budidaya mikroalga. Kriteria yang diajdiikan landasan antara lain cahaya matahari yang cukup, umumnya beriklim hangat, sumber CO₂ dan nutrisi lainnya, air dengan kualitas rendah dan lahan marginal. Penelitian ini juga menggunakan metode GIS dengan menggunakan data spasial yang lebih kompleks dan area yang lebih luas.

Penelitian Ubando, *et al.*, (2015) menggunakan metode *analytical hierarchy process* dalam pelihina lokasinya industri mikroalga di Filipina. Aspek yang menjadi kajian lebih kompleks dengan memperhitungkan pemilihan lokasi selain berdasarkan faktor tumbuh mikroalga. Antara lain ketersediaan sumber daya seperti CO₂, air, lahan, nutrisi, iklim dan sumber energi, lalu penerimaan sosial berhubungan dengan penyerapan tenaga kerja dan angka kemiskinan, biaya-biaya mencakup upah minimal, biaya air, biaya nutrisi, dan biaya listrik. Faktor sumber daya alam masih menjadi faktor terpenting kemudian penerimaan sosial. Ketersediaan air dan lahan, penyerapan tenaga kerja, dan upah minimum menjadi sub faktor yang paling berpengaruh.



Pendekatan lingkungan yang ditinjau secara spasial terhadap pemilihan lokasi budidaya dan produksi mikroalga ditinjau dari kriteria lingkungan dilakukan di Chile oleh Bravo-Fritz, *et al.* (2015) dan Brusca, *et al.* (2017) di Sicily. Faktor yang dijadikan rujukan secara umum seperti lahan di luar dari lahan pertanian dan seluruh area *privat*. Ke lerengan kurang dari 5%, altimetri kurang dari 500 m.dpl dan temperatur lebih besar dari 15°C, serta ketersediaan akses transportasi yang dukung. Kedua hasil penelitian menunjukan kriteria dan metode ukur dengan lebih spesifik.

Kajian pemilihan lokasi industri mikroalga di Indonesia belum banyak dilakukan. Industri berbasis mikroalga dengan skala besar pun belum banyak dikembangkan. Hal ini menjadikan aspek lokasi Indonesia dalam kaitannya dengan penggalian potensi wilayah untuk pengembangan industri mikroalga skala besar belum optimal. Padahal secara dukungan alam, Indonesia memiliki garis pantai terpanjang dengan ketersediaan cahaya matahari dan suhu yang cukup untuk tumbuh beragam mikroalga.

Penelitian ini menjadi tinjauan pendahuluan untuk tahapan penelitian selanjutnya. Mengadopsi kriteria pemilihan lokasi dari penelitian terdahulu. Umumnya studi pra pendirian dan perancangan industri dimulai dengan dasar analisis finansial. Perhitungan secara spasial dapat menjadi referensi untuk melakukan tinjauan lapangan pada lokasi yang terpilih. Penelitian terkait tentang studi kelayakan pendirian pabrik biodiesel dari mikroalga 8.500-10.00 ton/tahun dengan aspek finansial dan teknis telah dilakukan. Lestari (2013) menghitung kelayakan finansial pabrik biodiesel dengan produksi 8.500 ton/tahun di Indramayu dengan kebutuhan total area 14,5 ha dengan 90% dari luas area digunakan untuk kultivasi mikroalga. Bahan baku berupa mikroalga diperlukan sebanyak 39610,369 kg/hari. Kapasitas pabrik lebih besar dikaji oleh Satriawan (2017) untuk produksi biodiesel 10.000 to/ tahun di Palembang dengan kebutuhan luas lahan 10 ha. Bahan baku mikroalga harian diperlukan sebanyak 46.212 kg.

Pemilihan lokasi dengan mempertimbangkan aspek lingkungan dan dilakukan dengan pendekatan spasial, akan membantu dalam pembuatan keputusan sebelum dilakukan tindakan teknis. Pengembangan lanjutan dari penelitian ini dengan mempertimbangkan faktor ekologis yang lebih spesifik, seperti pertimbangan curah hujan, kadar karbon, aktivitas pasar, air tanah, vegetasi dan sungai, dapat meningkatkan akurasi penunjang keputusan penetapan lokasi area kultivasi mikroalga sekala besar.

Kesimpulan

Analisis spasial dapat digunakan untuk menentukan lokasi pemilihan area kultivasi mikroalga sekala besar. Pada pemilihan lokasi area kultivasi di Jawa Tengah dan Yogyakarta, ditemukan 283 lokasi dengan luas area di atas 50 ha. Ditinjau persebaran sisi utara dan selatan wilayah, sisi utara lebih banyak tersedia area dengan luas yang lebih besar. Hampir semuanya melingkupi sisi perairan Jawa Tengah dan hanya sedikit yang melingkupi Yogyakarta. Penelitian lanjutan dapat dilakukan untuk memastikan metode pemilihan lokasi area kultivasi yang lebih efektif.

Daftar Pustaka

- Basmal, J. 2008. Peluang dan Tantangan Produksi Mikroalga Sebagai Biofuel. *Squalen*. 3(1): 34-39
- Bravo-Fritz, C.P., Sáez-Navarrete, C.A., Herrer, L.A., Zeppelin., Ceac, R.G. 2015. Site selection for microalgae farming on an industrial scale in Chile. *Algal Research* Vol 11, 343-349.
- Brusca, S., Famoso, F., Lanzafame, R., Messina, M., Wilson, J. 2017. A Site Selection Model to Identify Optimal Locations for Microalgae Biofuel Production Facilities in Sicily (Italy). *International Journal of Applied Engineering Research*. 12 (24): 16058-16067
- Hadiyanto., Azim, M. 2012. Mikroalga Sumber Pangan dan Energi Masa Depan. UPT UNDIP Press, Semarang.



- Khotimah, K. 2018. Membangun Ketahanan Energi Pendukung Pertahanan Maritim Melalui Pemanfaatan Mikroalga sebagai Biodiesel bagi Masyarakat Pesisir. *Jurnal Pertahanan dan Bela Negara*. 8(1): 67-84
- Lestari, N.M.A. 2013. Prancangan Pabrik Biodiesel dari Mikroalga Dengan Kapasitas 8.500 Ton/Tahun. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Menteri Perindustrian Republik Indonesia. 2016. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia No 40/M-IND/PER/6/2016 tentang Pedoman Teknis Pendirian Kawasan Industri. Kementerian Perindustrian Republik Indonesia, Jakarta.
- Milbrandt, A., Jarvis, E. 2010. Resource Evaluation and Site Selection for Microalgae Production in India. National Renewable Energy Laboratory, Colorado. 2010
- Satriawan, H.B. 2017. Perancangan Pabrik Biodiesel dari Mikroalga dengan Kapasitas 10.000 Ton/Tahun. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Singh, J., Gu, S. 2010. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14(9): 2596-2610.
- Ubando, A.T., Felix, C.B., Promentilla, M.A.B., Culaba, A.B. 2015. Strategic site selection of microalgae industry in the Philippines using analytic hierarchy process. *Chemical Engineering Transactions*. 45: 325-330

Aktivitas Ekstrak Metanolik *Padina* sp. sebagai Renoprotektan

Sulistiyono Lie¹, Nastiti Wijayanti^{1*}

¹Laboratorium Fisiologi Hewan, Departemen Biologi Tropika, Fakultas
Biologi, Universitas Gadjah Mada. Jl. Teknika Selatan, Sekip Utara,
Yogyakarta 55281, Indonesia.

*corresponding author, e-mail: nastiti_wijayanti@ugm.ac.id

Abstrak. Fucoidan pada *Padina* sp. memiliki aktivitas antioksidan sehingga dapat digunakan pada berbagai kejadian terkait stres oksidatif. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari aktivitas ekstrak metanolik *Padina* sp. sebagai renoprotektan terhadap stres oksidatif pada sel Vero yang diinduksi H_2O_2 . Penelitian yang dilakukan meliputi penentuan aktivitas antioksidan *Padina* sp. dengan uji DPPH, pengukuran konsentrasi NO dengan reagen Griess, aktivitas sitotoksitas dan uji proliferasi sel pada sel Vero diinduksi H_2O_2 dengan uji MTT. Hasil penelitian menunjukkan *Padina* sp. memiliki aktivitas antioksidan DPPH dengan nilai IC_{50} 43,17 $\mu g/mL$, sementara hasil uji MTT memperlihatkan bahwa ekstrak metanolik *Padina* sp. memiliki nilai IC_{50} 40,4 $\mu g/mL$. Nilai IC_{50} ini menunjukkan bahwa ekstrak metanolik *Padina* sp. bersifat toksik pada sel Vero namun perlakuan dengan ekstrak ini mampu menurunkan konsentrasi NO akibat induksi H_2O_2 pada sel Vero. Hasil uji proliferasi sel menunjukkan induksi H_2O_2 menyebabkan penurunan viabilitas sel hingga $78,9 \pm 0,01\%$ dan pemberian ekstrak metanolik *Padina* sp. dengan variasi konsentrasi 1-30 $\mu g/mL$ dapat meningkatkan viabilitas sel hingga $95,01 \pm 0,03\%$. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak metanolik *Padina* sp. dengan aktivitas antioksidan tinggi mampu menjadi renoprotektan terhadap stres oksidatif yang diinduksi H_2O_2 . Studi lebih lanjut dibutuhkan untuk mempelajari fungsi biologis yang lain terkait dengan sifat toksik ekstrak metanolik *Padina* sp. pada sel Vero.

Kata Kunci: antioksidan; H_2O_2 ; *Padina* sp.; renoprotektan; sel Vero

Pendahuluan

Beberapa juta orang didiagnosis menderita kelainan ginjal setiap tahun di seluruh dunia. Gangguan ginjal akut paling sering



disebabkan oleh obat sintetik (Wink *et al.*, 2006). Masyarakat modern saat ini terpapar pada berbagai jenis tekanan oksidatif yang berasal dari lingkungan, pola makan, atau gaya hidup. Molekul yang sangat reaktif seperti spesies oksigen reaktif (SOR) dan radikal bebas seperti radikal anion superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), radikal hidroksil (HO^\bullet), dan oksigen singlet (1O_2) dihasilkan oleh stres oksidatif dalam tubuh. SOR yang diproduksi dalam tubuh dihilangkan oleh mekanisme pertahanan antioksidan (Qian *et al.*, 2008).

Stres oksidatif terjadi ketika ada ketidakseimbangan antara manifestasi sistemik spesies oksigen reaktif (SOR) dan kemampuan sistem biologis untuk mendetoksifikasi intermediet reaktif, atau untuk memperbaiki kerusakan yang disebabkan oleh SOR. Keadaan redoks seluler yang abnormal dapat menyebabkan toksisitas melalui produksi dan akumulasi SOR, termasuk radikal bebas dan peroksida, yang merusak komponen seluler termasuk DNA, protein, dan lipid. H_2O_2 dapat dengan mudah menembus membran sel dan bereaksi dengan ion intraseluler, yang menyebabkan kerusakan intraseluler (Wang *et al.*, 2017).

Terdapat senyawa bioaktif fucoidan yang terkandung di dalam *Padina* sp. Selama dekade terakhir, fucoidan yang diisolasi dari spesies yang berbeda telah dipelajari secara luas karena beragam aktivitas biologisnya, termasuk antikoagulan dan antitrombotik, antivirus, antitumor dan imunomodulator, antiinflamasi, pengurangan lipid darah, sifat antioksidan dan antikomplementer, aktivitas terhadap hepatopati, uropati dan ginjal (Li *et al.*, 2008). Makroalga *Padina* sp. merupakan salah satu spesies alga coklat yang hidup di zona intertidal pesisir Gunungkidul. Bioaktifitas *Padina* sp. telah dipelajari secara luas dan diketahui memiliki potensi sebagai penghasil bahan aktif yang berpotensi bagi dunia biomedis (Mohsin *et al.*, 2014).

Berdasarkan hal tersebut, maka makroalga *Padina* sp. sangat berpotensi sebagai sumber senyawa bioaktif yang kuat dan prospektif untuk dikembangkan, penelitian ini mempelajari potensi *Padina* sp. sebagai kandidat renoprotektan baru. Sehingga semakin banyak juga penelitian yang dapat dilakukan di daerah

intertidal Gunungkidul sebagai daerah pesisir yang memiliki biota laut dengan potensi yang besar dalam bidang kesehatan. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari aktivitas ekstrak metanolik *Padina* sp. sebagai renoprotektan terhadap stres oksidatif pada sel Vero yang diinduksi H_2O_2 .

Bahan dan Metode

Sampling dan Preparasi

Sampel *Padina* sp. sebanyak 200 gram diambil dari zona intertidal Pantai Porok, Gunungkidul. Sampel dipindahkan ke dalam *ice box* yang sudah diisi es batu secukupnya. Sebelum diekstraksi, *Padina* sp. dibersihkan dengan dibilas air mengalir sampai bersih, kemudian dikeringanginkan, kemudian dimasukkan ke oven suhu $50^{\circ}C$. Pelarut metanol 90% (perbandingan 1:10) ditambahkan sebanyak 500 mL kedalam gelas *baeker* yang berisi bubuk sampel dan ditutupi dengan *aluminium foil*. Sampel dimaserasi dengan *magnetic stirrer* selama 24 jam, kemudian difiltrasi dengan kertas saring *Whatman* No. 1. Filtrat dari hasil saringan kemudian di evaporasi menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu $40^{\circ}C$.

Uji Aktivitas Antioksidan

Pelarut metanol absolut digunakan pada ekstrak *Padina* sp. kemudian dibuat menjadi 5 seri pengenceran yaitu 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm. Sebanyak 0,5 ml dari masing-masing seri pengenceran ditambahkan 2 ml larutan DPPH 0,15 mM kemudian dihomogenkan dengan vorteks, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang ($27^{\circ}C$). Absorbansi diukur pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Asam askorbat digunakan sebagai kontrol positif dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, dan 20 ppm. Persentase inhibisi dihitung dengan menggunakan rumus (Moubayed *et al.*, 2016) :

$$\text{Persentase Inhibisi (\%)} = \frac{\text{Abs. larutan DPPH}}{\text{Abs. DPPH} + \text{Ekstrak}} \times 100\%$$



Uji Aktivitas Nitrogen Oksida (NO)

Sampel dalam *microtube* diambil sebanyak 150 μL dan ditambahkan 8 μL ZnSO_4 10%, kemudian divorteks selama 30 detik. Sebanyak 8 μL NaOH 5% ditambahkan ke *microtube* dan di vorteks selama 30 detik, kemudian di sentrifuge pada kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit. Pada 96-well plate ditambahkan masing-masing 50 μL supernatan sampel dan 50 μL NO standar konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, dan 100 μM . Sebanyak 50 μL reagen Griess II (sulfanilamide 1%) ditambahkan ke dalam supernatan sampel dan larutan NO standar dan diinkubasi selama 10 menit, kemudian ditambahkan reagen Griess I (NED 0,1%) dan diinkubasi selama 10 menit. Setelah itu diukur absorbansinya dengan *ELISA plate reader* pada panjang gelombang 595 nm.

Uji Sitotoksik Metode Microculture Tetrazolium Assay (MTT Assay)

Pada penelitian ini, sel Vero diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Sel Vero dibiakkan dalam media *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) yang sudah ditambahkan *fetal bovine serum* (FBS) 10%, penisilin-streptomisin 1% dan Amphotericin B (fungizon) 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sebanyak $0,5 \times 10^5$ sel/sumur ditumbuhkan dalam 96 well-platedan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO_2 , kemudian sebanyak 100 μL larutan ekstrak dengan konsentrasi 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, dan 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dimasukkan ke dalam sumuran dan diinkubasi selama 24 jam, kemudian ditambahkan 100 μL media MTT ke setiap sumuran dan diinkubasi selama 2-4 jam, kemudian ditambahkan 100 μL larutan *stopper* DMSO. Setelah diinkubasi semalam, kemudian dibaca dengan *ELISA reader*. Masing-masing sumuran dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm. Persentase sel hidup dan analisis nilai IC_{50} . Persen sel hidup dihitung menggunakan rumus (Merloo *et al.*, 2011):

$$\% \text{viabilitas} = \frac{\text{Absorbansi sel perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

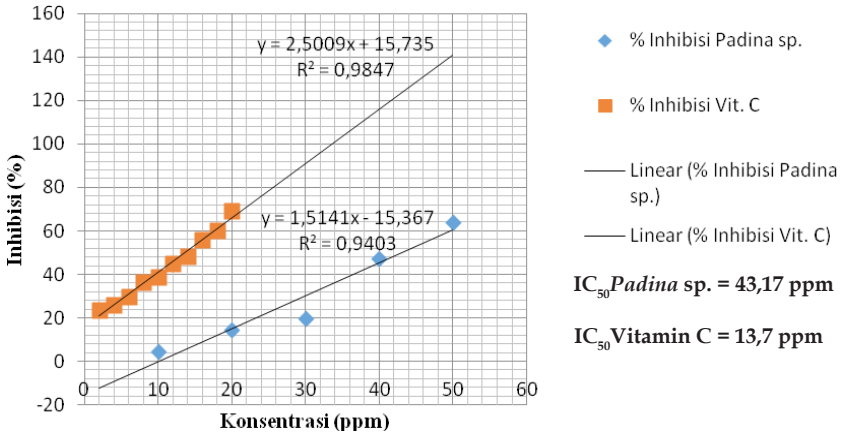
Uji Proliferasi Sel Metode Microculture Tetrazolium Assay (MTT Assay)

Sebanyak $0,5 \times 10^5$ sel/sumur ditumbuhkan dalam 96 *well-plate* dan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO_2 , kemudian sebanyak 100 μL larutan ekstrak konsentrasi 1, 10, 20, dan 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dimasukkan ke dalam sumuran dan ditambahkan 100 μL H_2O_2 1 μM , kemudian diinkubasi selama 30 menit. Pada sumuran yang sama ditambahkan serial konsentrasi ekstrak, kemudian diinkubasi 24 jam. Setelah 24 jam, sebanyak 100 μL media MTT ditambahkan ke setiap sumur, dan diinkubasi selama 2-4 jam, kemudian ditambahkan 100 μL larutan *stopper* DMSO. Setelah diinkubasi semalam, kemudian dibaca dengan *ELISA reader*. Masing-masing sumuran dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm. Data absorbansi yang diperoleh, kemudian dikonversi kedalam persen sel hidup.

Hasil

Aktivitas Antioksidan *Padina* sp.

Kemampuan antioksidan ditentukan dengan cara menghitung selisih penurunan nilai absorbansi DPPH terhadap absorbansi campuran ekstrak dan DPPH. Perbedaan panjang gelombang terjadi karena adanya perbedaan penggunaan pelarut dan deteksi alat pengukuran.

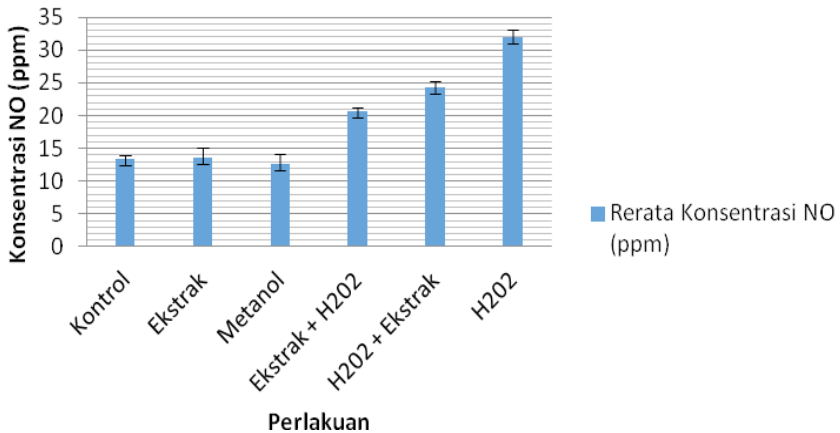


Gambar 1. Kurva linear antioksidan *Padina* sp. dan Vitamin C

Berdasarkan gambar 1 menunjukkan ekstrak metanolik *Padina* sp. memiliki nilai IC₅₀ 43,17 µg/mL (ppm). Dengan IC₅₀ tersebut menunjukkan bahwa ekstrak *Padina* sp. termasuk antioksidan yang sangat kuat karena mempunyai IC₅₀ < 50 ppm. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan terhadap aktivitas antioksidan Vitamin C dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, dan 20 ppm didapatkan nilai IC₅₀ sebesar 13,7 ppm.

Aktivitas Nitrogen Oksida (NO)

Analisis nitrit pada penelitian ini dilakukan dengan metode Griess secara spektrofotometri. Pada penelitian ini dilakukan analisis terhadap kadar NO pada sel Vero yang telah diberikan perlakuan dengan ekstrak metanolik *Padina* sp., H₂O₂ 1 µM, ekstrak+H₂O₂, medium kosong serta metanol. Penentuan kadar NO sel Vero dilakukan berdasarkan rata-rata hasil pengukuran absorbansi yang terukur.

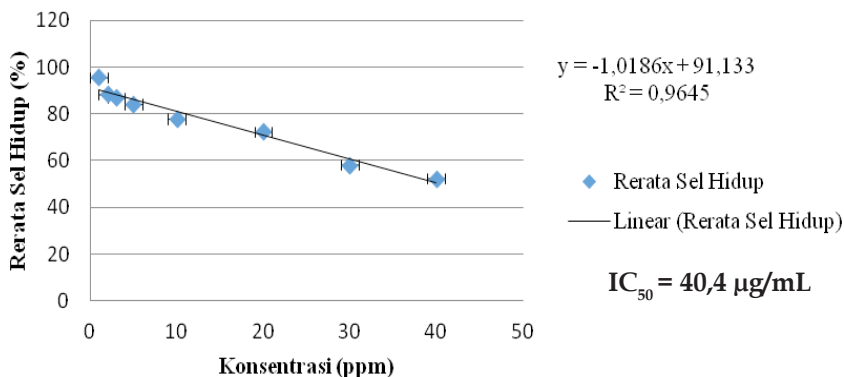


Gambar 2. Efek proteksi dan perbaikan sel Vero dengan berbagai perlakuan

Berdasarkan pada gambar 2, dapat diketahui konsentrasi NO sel Vero terkecil ditemukan pada sel yang diberikan perlakuan dengan ekstrak metanolik *Padina* sp. 10 µg/mL, medium kosong, dan metanol yang masing-masing memiliki konsentrasi NO sebesar 13,67±1,52; 13,34±0,57, dan 12,67±1,52 µg/mL. Pada penelitian ini, konsentrasi NO sel Vero tertinggi ditemukan pada sel yang diberikan perlakuan hanya dengan H₂O₂ sebesar 32±1,15 µg/mL.

Sitotoksitas Ekstrak Metanolik Padina sp. terhadap Sel Vero

Pengujian sitotoksik ekstrak metanolik *Padina* sp. ini digunakan untuk mengetahui konsentrasi optimal yang akan digunakan dalam uji proliferasi sel Vero.

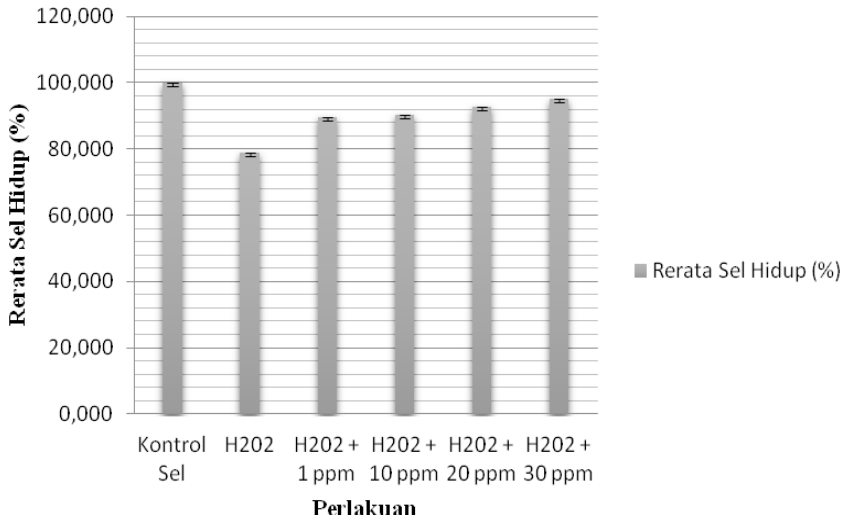


Gambar 3. Persentase viabilitas rerata sel Vero setelah perlakuan dengan ekstrak metanolik *Padina* sp. selama 24 jam

Pada penelitian ini, diperoleh nilai IC_{50} sitotoksik ekstrak metanolik *Padina* sp. sebesar $40,4 \mu\text{g/mL}$. Pada Gambar 3, jumlah sel Vero yang hidup semakin berkurang dengan penambahan ekstrak metanolik *Padina* sp. yang semakin tinggi. Hal ini menunjukkan adanya hubungan yang tidak linear atau tidak berbanding lurus antara jumlah sel yang hidup dengan peningkatan konsentrasi ekstrak metanolik yang diberikan.

Proliferasi Sel Vero

Dalam model eksperimental ini, kerusakan oksidatif didefinisikan oleh kematian sel, dan bahwa ini mungkin disebabkan oleh beragam disfungsi seluler dan kerusakan biokimia yang berbeda dalam menanggapi H_2O_2 , terutama sebagai proses oksidatif yang diinduksi. Perlakuan dengan ekstrak metanolik *Padina* sp. kemudian akan menyebabkan penurunan yang signifikan dari kematian sel.



Gambar 4. Rerata viabilitas sel Vero dengan berbagai perlakuan

Pada perlakuan $H_2O_2 + 1$ ppm menunjukkan persen viabilitas sebesar $89,58 \pm 0,03\%$; $H_2O_2 + 10$ ppm sebesar $90,18 \pm 0,01\%$; $H_2O_2 + 20$ ppm sebesar $92,59 \pm 0,03\%$ dan $H_2O_2 + 30$ ppm $95,01 \pm 0,03\%$. Berdasarkan Gambar 4 di atas dapat dilihat bahwa H_2O_2 digunakan sebagai sumber stres oksidatif dalam penelitian ini, konsentrasi $1 \mu M$ digunakan untuk menginduksi kerusakan sel, pada konsentrasi tersebut terjadi penurunan viabilitas sel hampir 30% dibandingkan dengan kontrol sel Vero tanpa perlakuan H_2O_2 .

Pembahasan

Aktivitas Antioksidan *Padina* sp.

Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat apabila nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm, kuat apabila nilai IC_{50} antara 50-100 ppm, dan lemah apabila nilai IC_{50} berkisar antara 150-200 ppm (Molyneux, 2004). Nilai IC_{50} antioksidan dapat diartikan bahwa semakin rendah nilai IC_{50} antioksidan maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Pada penelitian ini menunjukkan ekstrak metanolik *Padina* sp. memiliki nilai IC_{50} $43,17 \mu g/mL$. Hal tersebut disebabkan karena dengan penggunaan konsentrasi yang semakin



rendah sudah dapat menghambat DPPH sebesar 50%. Nilai IC_{50} tersebut dapat diartikan bahwa dengan penggunaan 43,17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ekstrak *Padina* sp. dapat menghambat DPPH sebesar 50%.

Aktivitas Nitrogen Oksida (NO)

NO bereaksi dengan oksigen untuk menghasilkan oksida nitrogen reaktif (NO_x), yang dapat terbentuk secara istimewa dalam membran lipid, namun jumlah yang terbentuk secara *in vivo* tidak pasti. NO meningkatkan stres oksidatif yang disebabkan oleh hidrogen peroksida (Ioannidis & Groot, 2003). Pada penelitian ini, sel Vero yang hanya ditambahkan dengan H_2O_2 mempunyai konsentrasi NO tertinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Sementara itu, pada sel Vero dengan perlakuan ekstrak+ H_2O_2 dan H_2O_2 +ekstrak menghasilkan konsentrasi NO yang lebih rendah dibandingkan dengan sel yang ditambahkan H_2O_2 saja. Hal ini menunjukkan adanya efek dari ekstrak metanolik *Padina* sp. yang dapat menurunkan konsentrasi NO pada sel Vero yang ditambahkan dengan H_2O_2 .

Sitotoksitas Ekstrak Metanolik *Padina* sp. terhadap Sel Vero

Nilai IC_{50} sitotoksik ekstrak metanolik *Padina* sp. sebesar 40,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. IC_{50} merupakan nilai suatu konsentrasi yang dapat mematikan atau menghambat 50% jumlah sel dalam suatu populasi dan nilai ini yang menentukan tingkat potensi suatu senyawa dalam menghambat pertumbuhan sel. Nilai IC_{50} tersebut dapat diartikan bahwa dengan penggunaan 40,04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ekstrak metanolik *Padina* sp. dapat menghambat pertumbuhan sel Vero sebesar 50%. Semakin rendah nilai IC_{50} , maka semakin tinggi potensi suatu senyawa dalam menghambat pertumbuhan sel. Hal ini menandakan bahwa konsentrasi ekstrak yang lebih sedikit dapat menghambat sel dengan jumlah yang sama yaitu 50%. Sehingga konsentrasi larutan uji yang lebih kecil dari nilai IC_{50} sitotoksik mempunyai nilai aktivitas perlindungan sel yang lebih besar, sedangkan dengan konsentrasi larutan uji yang lebih besar dari nilai IC_{50} sitotoksik menunjukkan penurunan jumlah sel hidup.

Proliferasi Sel Vero

Penambahan konsentrasi ekstrak metanolik *Padina* sp. yang semakin tinggi pada sel yang telah ditambahkan H_2O_2 dapat membangun kembali viabilitas sel dan proliferasi sel dengan tingkat yang dekat dengan yang ditemukan dalam kontrol sel. Konsentrasi larutan uji lebih kecil dari nilai IC_{50} sitotoksik mempunyai nilai aktivitas perlindungan sel yang lebih besar. Oleh karena itu, pada uji proliferasi ini digunakan konsentrasi larutan uji kurang dari 40,4 $\mu g/mL$ yaitu, sebesar 1; 10; 20 dan 30 $\mu g/mL$.

Beberapa literatur menyebutkan bahwa pada makroalga *Padina* sp. memiliki kandungan fucoidan (polisakarida tersulfasi). Rumput laut memiliki kandungan polisakarida yang sangat tinggi, yang umumnya terdiri dari karaginan, fucoidan, dan alginat. Biasanya, polisakarida alga memiliki sifat fisikokimia yang unik, dan memiliki antioksidan kuat, anti-inflamasi, antikanker, anti-koagulan, radioprotektif, mengaktifkan kekebalan, dan bioaktivitas renoprotektif (Yang *et al.*, 2011). Berdasarkan hal tersebut makroalga *Padina* sp. yang berasal dari zona intertidal Gunungkidul memiliki potensi sebagai kandidat senyawa renoprotektan. Namun hal tersebut perlu dikaji lebih lanjut untuk membuktikan adanya senyawa yang memiliki aktivitas renoprotektif dengan purifikasi ekstrak kasar. Dengan diketahui senyawa aktif yang terkandung dalam makroalga *Padina* sp. serta aktivitasnya, maka dapat dilanjutkan dengan usaha sintesis senyawa tersebut. Usaha tersebut harus pula diikuti dengan konservasi spesies makroalga sumber bahan aktif sehingga akan melestarikan keberadaan spesies tersebut di alam.

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan maka dapat disimpulkan penambahan konsentrasi ekstrak metanolik *Padina* sp. yang semakin tinggi (30 $\mu g/mL$) pada sel yang telah ditambahkan H_2O_2 dapat mengembalikan viabilitas sel dan proliferasi sel (95,01 \pm 0,03%). Ekstrak metanolik *Padina* sp. mampu berfungsi sebagai renoprotektan yang dapat melawan stress oksidatif pada sel Vero yang di induksi H_2O_2 .



Daftar Pustaka

- Ioannidis I and Groot H. 2003. Cytotoxicity of nitric oxide in FU5 hepatoma cells: evidence for co-operative action with hydrogen peroxide. *Biochemistry Journal*. (296):341-345.
- Li B, Lu F, Wei X, and Zhao R. 2008. Fucoidan: Structure and Bioactivity. *Molecules*. (13):1671-1695.
- Merloo J, Kaspers GJL, and Cloos J. 2011. Cell Sensivity Assays: The MTT Assay. London: Human Press. p. 237-244.
- Mohsin S, Mahadevan R, Kurup GM. 2014. Free-radical scavenging activity and antioxidant effect of ascophyllan from marine brown algae *Padina tetrastrum*. *Biomedicine and Preventive Nutrition*. (4):75-79.
- Molyneux P. 2004. The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Journal of Science and Technology*. 26(2): 212-219.
- Moubayed NMS, Al Houry HJ, Al Khulaifi MM, and Al Farraj DA. 2016. Antimicrobial, Antioxidant Properties and Chemical Composition of Seaweed Collected from Saudi Arabia (Red Sea and arabian Gulf). *Saudi Journal of Biology Science*. (2):1-8.
- Qian ZJ, Jung WK., and Kim SK. 2008. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Bioresource Technology*. (99):1690-1698.
- Wang L, Ryu B, Kim W, Kim GH, and Jeon Y. 2017. Protective effect of gallic acid derivatives from the freshwater green alga *Spirogyra* sp. against ultraviolet B-induced apoptosis through reactive oxygen species clearance in human keratinocytes and zebrafish. *Algae*. 32(4): 379-388.
- Wink DA, Cook JA, Pacelli R, De Graff W, Gamson J, Liebmann J, and Mitchell JB. 2006. The effect of various nitric oxide-donor agents on hydrogen peroxide-mediated toxicity: a direct correlation between nitric oxide formation and protection. *Archives of biochemistry and biophysics*. 331(2):241-248.
- Yang X, Kang M, and Lee K. 2011. Antioxidant activity and cell protective effect of loliolide isolated from *Sargassum ringgoldianum* subsp. coreanum. *Algae*. (26):201-208.

Peranan Bioteknologi dalam Mendukung Program Konservasi Angsana (*Pterocarpus Indicus* Willd), Jenis Pohon Terancam Punah

Vivi Yuskianti^{1*}, dan Yelnitis¹

¹Balai Besar Litbang Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan
Jl. Palagan Tentara Pelajar Km. 15, Purwobinangun, Pakem, Sleman, DI
Yogyakarta, Indonesia 55582.

*Corresponding author: vivi_yuskianti@yahoo.com

Abstrak. Tidak banyak yang mengetahui bahwa angšana (*Pterocarpus indicus* Willd.) telah dikategorikan sebagai jenis pohon terancam punah. Sebagai jenis yang mempunyai beragam manfaat antara lain untuk pembuatan furnitur, kabinet, kerajinan; berpotensi sebagai obat-obatan dan pewarna alami; serta direkomendasikan sebagai tanaman peneduh/taman kota dan sistem agroforestri, angšana sebenarnya memiliki dua subspecies/ forma yang dibedakan berdasarkan penampakan kulit buahnya yaitu *indicus* (tidak berduri) dan *echinatus* (berduri). Di dalam makalah ini akan dipaparkan pengalaman dan peran bioteknologi dalam mendukung konservasi angšana di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan, Yogyakarta. Ada dua bidang bioteknologi yang terlibat yaitu molekuler genetik/analisis DNA dan kultur jaringan. Analisis DNA menggunakan penanda *Random Amplified Polymorphism DNA* (RAPD) menunjukkan keragaman genetik yang cukup rendah (rata-rata sebesar 0,2024) dan adanya dua kelompok hubungan kekerabatan pada enam populasi angšana asal Indonesia bagian timur. Hasil DNA ini mengindikasikan menurunnya variasi genetik angšana di alam yang sejalan dengan temuan lapangan. Selain itu, metode perbanyakan kultur jaringan menggunakan stek satu buku memberikan hasil yang menjanjikan untuk perbanyakan angšana secara vegetatif.

Kata kunci: angšana (*Pterocarpus indicus*), terancam punah, analisis DNA, kultur jaringan, konservasi



Pendahuluan

Upaya konservasi jenis-jenis langka dan terancam punah memerlukan kerjasama dan integrasi dari berbagai bidang keahlian. Bidang genetika molekuler/analisis DNA dan kultur jaringan dapat digunakan untuk mendukung program konservasi. Genetika molekuler seperti penanda RAPD dapat digunakan untuk mengetahui tingkat keragaman genetik dan hubungan kekerabatan (Randriani *et al.*, 2012) antar berbagai populasi di alam, sementara kultur jaringan bermanfaat untuk mendapatkan metode perbanyakan tanaman secara massal (Shahinozzaman *et al.*, 2012). Pemanfaatan kedua bidang bioteknologi ini dapat secara langsung mendukung upaya konservasi.

Angsana (*Pterocarpus indicus* Willd), jenis pohon besar (dapat mencapai tinggi 33 m dan diameter 2 m) (Orwa *et al.*, 2009), mempunyai sebaran alami di Asia Tenggara-Pasifik, dari Selatan Burma melalui Asia Tenggara ke Filipina dan pulau-pulau pasifik lainnya (Jøker, 2000). Sebagai tanaman pionir dan kinerja baik di areal terbuka, angšana dapat tumbuh pada berbagai jenis tanah baik tanah pertanian subur sampai tanah berbatu, pada ketinggian hingga 600 m atau bahkan dapat mencapai 1.300 m dpl (Jøker, 2000). Di Indonesia angšana tersebar secara alami di seluruh Jawa dan Sulawesi, Maluku, Bali, NTB dan NTT, dan Papua (Putri & Suita, 2005). Sebarannya yang luas membuat jenis ini dikenal dengan beberapa nama lokal di Indonesia seperti sonokembang, narra, linggua, dan kayu merah.

Tidak banyak yang mengetahui bahwa angšana termasuk jenis terancam punah. Populasi angšana di alam telah menurun akibat eksploitasi yang berlebihan, penebangan liar, dan kehilangan habitat. Populasi angšana di Vietnam telah punah sejak 300 tahun yang lalu, survey intensif di Srilangka gagal menemukan spesies ini, dan di India, Indonesia dan Filipina telah dikategorikan terancam punah (Jøker, 2000). Oleh karena itu, sejak tahun 2019, the IUCN *Red List of Threatened Species* telah menaikkan status konservasi angšana dari rawan (*Vu*) menjadi terancam punah (*EN*) (IUCN, 2019).

Kayu angšana termasuk kayu berkualitas tinggi dengan kelas awet I/II, kelas kuat I/III, dan BJ antara 0,4-0,9 (Heyne, 1987). Kayunya cukup keras, cukup berat, mudah dikerjakan, beraroma mawar, mempunyai beragam warna dari kuning menjadi merah, dengan cincin pertumbuhan yang mencolok sehingga menjadi kayu favorit, contoh di Filipina, untuk pembuatan furniture, lemari, roda gerobak, ukiran, konstruksi dan alat music (Orwa *et al.*, 2009). Bagian tanaman seperti daun dan kulit batang mempunyai potensi sebagai sebagai obat-obatan; obat alergi (Cha *et al.*, 2016), dan obat diabetes (Dharmawan, 2013), serta pewarna alami pada batik sutra (Lestari & Satria, 2017). Angšana juga dapat menfiksasi nitrogen (Lestari & Satria, 2017) dan banyak direkomendasikan pada sistem agroforestry (Jøker, 2000). Kemampuan angšana mengakumulasi partikulat dan timbal (Pb) (Julianty, Nurzaman, & Mutaqin, 2015) membuat jenis ini banyak digunakan sebagai tanaman peneduh pinggir jalan dan taman kota.

Sedikit yang mengetahui bahwa ada dua subspecies/forma angšana yang dibedakan berdasarkan penampakan kulit buah yaitu *P. indicus* forma *indicus* (tidak memiliki duri) dan forma *echinatus* (memiliki duri) (Orwa *et al.*, 2009). Riset dan pemanfaatan angšana yang selama ini telah dilakukan tampaknya hanya terbatas pada satu jenis saja yaitu *P. indicus* forma *indicus* (tidak memiliki duri pada kulit buahnya), sementara untuk jenis berduri (forma *echinatus*) belum banyak dilakukan. Di dalam makalah ini akan dipaparkan pengalaman melakukan konservasi angšana dan memaparkan peranan bioteknologi dalam mendukung program konservasi angšana di Indonesia, khususnya di Balai Besar Litbang Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan (BBPPBPTH) Yogyakarta. Melalui kegiatan ini, materi genetik angšana telah berhasil dikoleksi dari lima pulau di Indonesia dan dua plot konservasi eks situ angšana berhasil dibangun di dua lokasi yaitu Petak 95, Playen Gunung Kidul, DI Yogyakarta, dan KHDTK Wonogiri, Jawa Tengah.



Hasil dan Pembahasan

Peranan bioteknologi dalam mendukung konservasi angšana

Upaya konservasi angšana memadukan beberapa bidang keahlian. Kegiatan tersebut berlangsung secara simultan dan berkesinambungan untuk memaksimalkan upaya pelestarian angšana di Indonesia. Bidang genetika molekuler berperan disaat awal setelah dilakukan eksplorasi dan koleksi materi genetik di sebaran alami angšana di Indonesia. Saat eksplorasi di alam, tiga jenis materi genetik dikoleksi secara bersamaan yaitu sampel buah (benih) yang akan digunakan untuk pembangunan plot konservasi eks situ; sampel daun untuk analisis DNA, dan sampel tanah untuk mengetahui kondisi habitat angšana di sebaran alamnya. Kegiatan konservasi angšana direncanakan selama 5 tahun (2015-2019) (Gambar 1) (Yuskianti *et al.*, 2015).

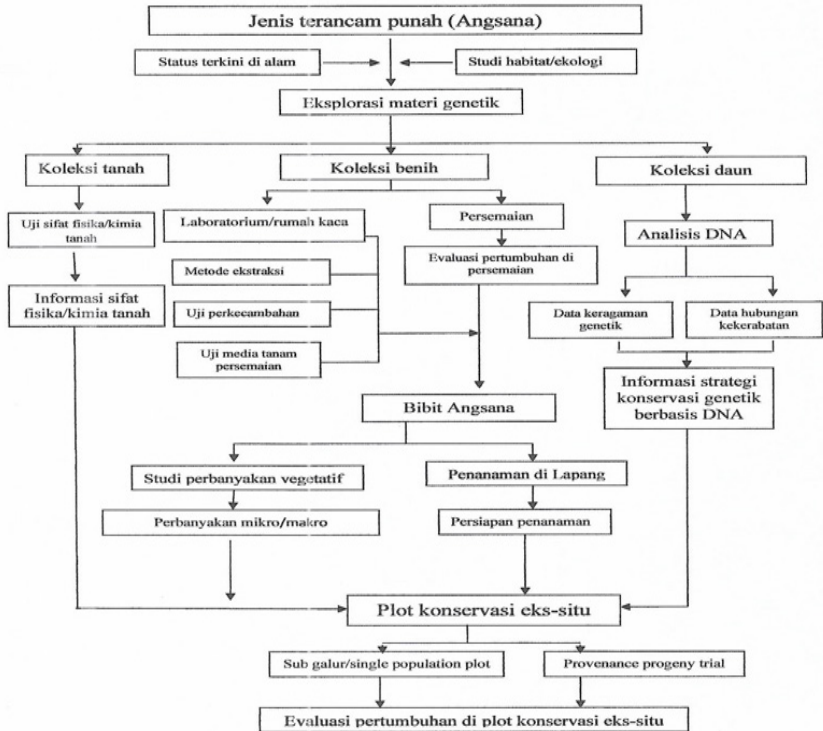
Genetika molekuler/analisis DNA

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) adalah salah satu penanda DNA yang dapat digunakan untuk analisis keragaman genetik dan mengetahui hubungan kekerabatan (Randriani *et al.*, 2012) antar berbagai populasi angšana. Penanda RAPD bersifat dominan dan terdiri dari 10 atau 15 susunan basa yang teramplifikasi secara acak dalam keseluruhan sekuen DNA (Nurtjahjaningsih *et al.*, 2016). Prosedur RAPD juga relatif mudah dan cepat sehingga sering digunakan untuk analisis keragaman genetik (Randriani *et al.*, 2012; Nurtjahjaningsih *et al.*, 2016).

Keragaman genetik dalam dan antar populasi dari tiap jenis apabila telah diketahui, maka perbedaan genetik populasi dengan kecenderungan *out crossing rate* yang tinggi dapat dijadikan sumber konservasi genetik. Adanya keragaman genetik yang tinggi dan *out crossing rate* dapat menjamin tingkat presentase ketahanan hidup, kemampuan, resistansi terhadap hama dan penyakit generasi selanjutnya tanpa terpengaruh terhadap perubahan yang terjadi (Yuskianti *et al.*, 2015).

Enam populasi angšana yaitu asal Kupang, Kefamenanu-Timor Tenga Utara, Manggarai Timur-Flores, Ngada-Flores, Soes_Timur Tenga Selatan, dan Palau Seram di Maluku dianalisis

STRATEGI KONSERVASI GENETIK JENIS ANGSANA (*Pterocarpus indicus*)



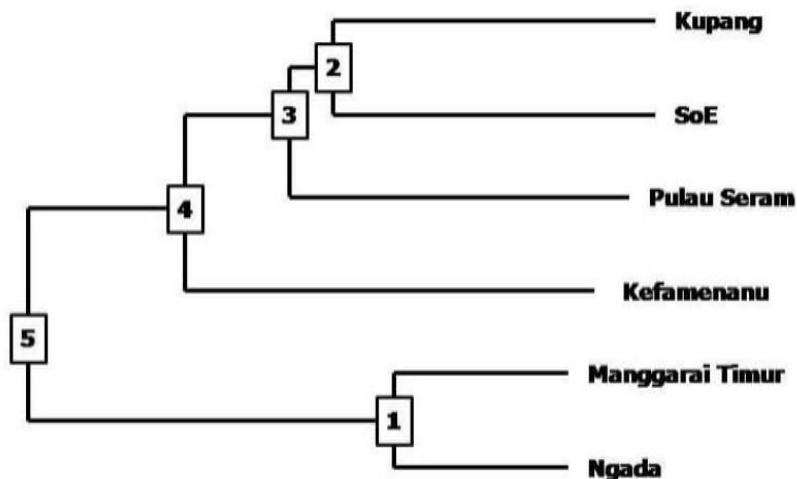
Gambar 1. Diagram kegiatan konservasi angšana di BBPPBPTH Yogyakarta

DNA menggunakan 12 primer RAPD. Sampel daun diekstraksi menggunakan metode CTAB yang dimodifikasi (Shiraishi & Watanabe, 1995). Proses PCR menggunakan temsikler GeneAmp 9700 (Applied Biosystem). Hasil PCR kemudian dielektroforesis menggunakan gel agarose 1.0% yang dicampur dengan Ethidium Bromide dan dialiri listrik 120 volt selama 2,5 jam (Sulistiyawati & Widyatmoko, 2017).

Hasil analisis Popgene menunjukkan bahwa rerata nilai keragaman genetik di dalam enam populasi angšana sebesar 0,2024 dengan populasi Soe memiliki keragaman genetik di dalam populasi paling tinggi (0,2925) dan terendah di populasi

Ngada (0,1212) (Sulistyawati & Widyatmoko, 2017). Hasil analisis keragaman genetik enam populasi angšana mengindikasikan rendahnya keragaman genetik angšana di sebaran alamnya di alam. Hasil ini sejalan dengan hasil temuan angšana di lapangan. Hasil pengamatan di Pulau Flores, Nusa Tenggara Timur menunjukkan sulitnya menemui sebaran alami angšana di alamnya. Umumnya masyarakat mendapatkan angšana dengan cara menebang tanpa ada upaya penanaman kembali, selain itu regenerasi alami angšana di alam juga sering gagal karena banyak anakan yang mati saat pembukaan lahan (Yuskianti, Ismail, & Pamungkas, 2017). Kondisi hampir serupa juga ditemui di Dompu, Pulau Sumbawa, Nusa Tenggara Barat dimana banyak ditemukannya penebangan liar kayu angšana di alam (Yuskianti, Ismail, & Yuliah, 2017).

Hasil analisis kluster menunjukkan bahwa terdapat dua pengelompokkan besar angšana yaitu: 1) kelompok populasi Kupang, Soe, Pulau Seram dan Kefamenanu, dan 2) kelompok populasi Manggarai Timur dan Ngada (Gambar 2) (Sulistyawati & Widyatmoko, 2017).



Gambar 2. Dendrogram enam populasi angšana berdasarkan penanda RAPD.

Dari hasil dendrogram ini diduga bahwa populasi Kupang, Soe, Pulau Seram dan Kefamenanu berasal dari sumber populasi yang sama. Hasil analisis kaster dan PCoA juga menunjukkan bahwa populasi yang berasal dari pulau Timor yaitu populasi Kupang, Soe dan Kefamenanu mempunyai kekerabatan yang lebih dekat. Hal ini terjadi karena tiga populasi tersebut berasal dari satu pulau yaitu Pulau Timor dan tidak terdapat barrier alami yang mampu menghalangi aliran gene (*gene flow*) antar populasi tersebut (Sulistyawati & Widyatmoko, 2017). Hal serupa juga ditemui pada dua populasi asal pulau Flores yaitu Manggarai Timur dan Ngada dimana keduanya diduga berasal dari populasi yang sama, atau dapat dianggap sebagai satu populasi (Sulistyawati & Widyatmoko, 2017). Secara geografis, kedua populasi dari wilayah Pulau Flores lebih dekat dengan tiga populasi di wilayah Pulau Timor, tetapi secara genetik populasi Pulau Timor lebih dekat dengan populasi Seram yang secara geografis letaknya lebih berjauhan (Sulistyawati & Widyatmoko, 2017).

Dugaan lain dari hasil pengelompokkan/klaster menggunakan penanda RAPD menunjukkan kemungkinan keterkaitan pengelompokkan secara genetik dengan perbedaan subspecies/forma pada populasi angkana tersebut. Eksplorasi dan koleksi materi genetik angkana dari lima sebaran alami angkana di Indonesia menunjukkan ada dua jenis angkana yang dibedakan berdasarkan penampakan kulit buah yaitu tidak berduri (*P. indicus* forma *indicus*) dan berduri (forma *echinatus*) (Yuskianti *et al.*, 2015). Pembagian klaster angkana secara genetik merujuk juga perbedaan forma angkana yaitu klaster pertama (Kupang, Soe, Pulau Seram, dan Kefamenanu) merupakan jenis angkana yang tidak memiliki duri pada kulit buahnya (forma *indicus*), sementara klaster angkana kedua (Manggarai Timur dan Ngada) merupakan jenis angkana berduri (forma *echinatus*) (Tabel 1) (Yuskianti *et al.*, 2015).



Tabel 1. Informasi hasil koleksi materi genetik angšana di Indonesia

Asal	Populasi (Lokasi)	Jenis angšana
Nusa Tenggara Timur (Pulau Flores)	Kabupaten Ngada (Desa Lekogoko, kec. Aimeree)	Berduri
	Kab. Manggarai Timur (desa Watunggene, Kec. Kota Komba)	Berduri
Maluku (Pulau Seram)	Kab. Pulau Seram Barat (desa Hatusua, kec. Kairatu)	Tidak Berduri
Nusa Tenggara Barat (Pulau Sumbawa)	Kab. Bima (desa Lampe, kec. Rasanae Timur)	Berduri
	Kab. Dompu (Lakey, desa Hu'u, kec. Hu'u)	Berduri
Nusa Tenggara Timur (Pulau Timor)	Kab. Kupang, kec. Nekbaun	Tidak Berduri
	Kab. Timor Tengah Selatan, kec. Biloto	Tidak Berduri
	Kec. Kefamenanu,	Tidak Berduri
Nusa Tenggara Timur (Pulau Alor)	Kab. Alor (kec. Alor Barat Daya)	Tidak Berduri
	Kab. Alor (kec. Alor Timur)	Berduri

Informasi keragaman genetik berperan penting untuk mendukung kegiatan konservasi dan pemuliaan angšana di Indonesia. Berdasarkan hasil analisis genetik ini diketahui bahwa untuk kegiatan konservasi angšana baik *in-situ* maupun *eks situ* perlu memperhatikan pembagian wilayah berdasarkan keragaman genetik (Sulistyawati & Widyatmoko, 2017). Lebih lanjut juga dijelaskan juga bahwa untuk kegiatan pemuliaan atau pengembangan angšana, perlu memperhatikan keragaman genetik dari masing-masing populasi, jarak genetik antar populasi dan pengelompokkan populasi (Sulistyawati & Widyatmoko, 2017).

Kultur Jaringan

Kultur jaringan adalah teknik pembiakan tanaman dengan menumbuhkan organ, jaringan, dan sel tanaman secara *in-vitro* (Banerjee, 2013). Keuntungan penggunaan teknologi kultur

jaringan sebagai teknik dalam program pemuliaan dan produksi klon secara massal adalah terletak pada potensinya yang amat besar (secara potensial tidak terbatas) dalam tingkat multiplikasi (Thorpe & Patel, 1984)

Teknik kultur jaringan angsa dikembangkan menggunakan bahan anakan angsa dengan tinggi 1 – 1,5 meter yang ada di persemaian BBPPBPTH Yogyakarta. Batang yang dijadikan eksplan adalah bagian yang berwarna hijau. Bahan kimia yang digunakan terdiri dari hara makro, mikro, vitamin dari komposisi media dasar Murashige dan Skoog (MS) yang diperkaya dengan sukrosa digunakan sebagai media tumbuh. Sebagai pematat digunakan agar sebanyak 10 gr/l. Sebagai perlakuan ditambahkan zat pengatur tumbuh BA dengan konsentrasi 0.1 – 0.75 mg/l dan kinetin 1.0 – 3.0 mg/l.

Hasil penelitian menunjukkan penggunaan jenis tanaman, tipe eksplan, konsentrasi sterilan dan waktu yang digunakan dalam proses sterilisasi merupakan faktor penentu terhadap keberhasilan jaringan yang dikulturkan. Pada penelitian ini eksplan batang satu buku tanaman kayu merah dan waktu yang cocok dalam proses sterilisasi merupakan faktor yang bersinergi sehingga dihasilkan eksplan yang steril dengan persentase yang tinggi. Dari enam perlakuan yang digunakan diperoleh persentase eksplan steril antara 96.6 – 100 % (Tabel 2) sampai umur 10 minggu. Hal ini diduga disebabkan karena batang kayu merah yang masih muda mempunyai batang yang licin sehingga proses sterilisasi lebih mudah dibandingkan dengan eksplan batang satu buku dari tanaman yang berbulu seperti pada tanaman gaharu dan tanaman lainnya yang tidak licin.



Tabel 2. Persentase eksplan steril dan visual biakan dari perlakuan BA dan kinetin.

Perlakuan (mg/l)	Eksplan steril (%)	Visual biakan
MS + BA 0.10	100	pangkal eksplan berkalus
MS + BA 0.50	100	pangkal eksplan berkalus
MS + BA 0.75	100	pangkal eksplan berkalus
MS + kinetin 1.0	96.6	semua bagian eksplan kalus
MS + kinetin 2.0	100	semua bagian eksplan kalus
MS + kinetin 3.0	100	semua bagian eksplan kalus

Eksplan batang satu buku yang ditumbuhkan pada perlakuan BA dan kinetin dengan konsentrasi berbeda memperlihatkan respon yang berbeda. Eksplan yang ditumbuhkan pada perlakuan BA (0.1 – 0.75 mg/l) umumnya mulai memperlihatkan respon pada minggu pertama (tiga hari) setelah diinokulasi sedangkan pada perlakuan kinetin (1.0 – 3.0 mg/l) respon pertama dapat diamati pada minggu kedua. Semua perlakuan dapat menginduksi tunas yang diikuti dengan pembentukan kalus mulai dari pangkal eksplan batang satu buku sampai pada bagian titik tumbuh tunas (Gambar 3).

Dari perlakuan BA (0.1 – 0.75 mg/l) dan kinetin (1.0 – 3.0 mg/l) yang digunakan dihasilkan rata-rata jumlah tunas antara 1 – 2 tunas. Penggunaan kinetin 1.0 mg/l merupakan perlakuan terbaik untuk menghasilkan tunas dengan rata-rata jumlah tunas sebanyak 1.25 tunas.

Peningkatan konsentrasi BA dari 0.1 mg/l menjadi 0.5 mg/l dapat merangsang tunas menjadi lebih tinggi dengan ruas yang lebih panjang sedangkan peningkatan konsentrasi BA dari 0.5 mg/l menjadi 0.75 mg/l cenderung menghasilkan tunas yang lebih pendek. Diduga pada konsentrasi yang lebih tinggi, BA berperan dalam proses pembelahan sel kearah samping sehingga tunas yang dihasilkan lebih besar dan lebih pendek (Gambar 3c). Dari enam perlakuan yang digunakan, tunas yang dihasilkan pada perlakuan kinetin lebih tinggi dibandingkan dengan tunas yang diperoleh pada perlakuan BA. Tunas yang paling tinggi

dihasilkan dari perlakuan kinetin 3.0 mg/l (Gambar 3e). Rata-rata tinggi tunas yang dihasilkan dari perlakuan ini adalah 6.1 cm dan berbeda nyata dengan perlakuan yang lain sampai umur 10 minggu. Walaupun pada semua bagian eksplan terbentuk kalus tetapi adanya kalus tidak mempengaruhi pertumbuhan tunas kearah tinggi tunas.



Gambar 3. Tunas dari perlakuan BA 0.1 mg/l (a), BA 0.5 mg/l (b), BA 0.75 mg/l, kinetin 1.0 mg/l (d), kinetin 2.0 mg/l (e) dan kinetin 3.0 mg/l (f).

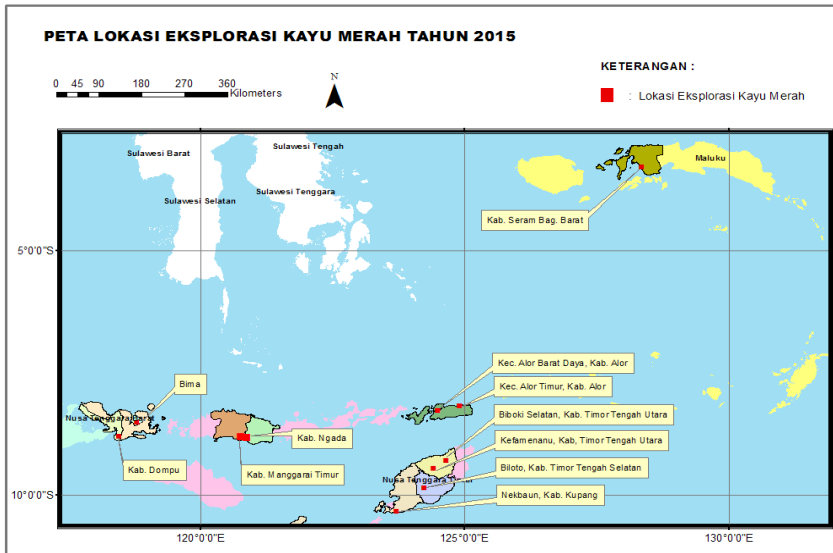


Secara visual, perlakuan BA pada semua konsentrasi memperlihatkan biakan yang lebih segar, kuat dengan batang yang lebih besar dan lurus sedangkan pada semua konsentrasi kinetin yang digunakan, biakan tunas yang dihasilkan mempunyai batang yang lebih kecil dan ukuran yang lebih tinggi. Pada semua bagian eksplan ditumbuhi kalus.

Hasil penelitian awal mengenai perbanyakan angšana menggunakan teknik kultur jaringan memberikan hasil yang menjanjikan untuk dapat diaplikasikan secara lebih luas. Penelitian ini masih berupa tahap awal dan masih perlu dilanjutkan menggunakan bahan tanaman dan kombinasi media tanam dan hormon lainnya. Beberapa keuntungan penggunaan kultur jaringan antara lain (1) efektif dalam penggunaan ruang/tempat untuk penanaman dan pertumbuhan eksplan, (2) plantlet yang dihasilkan bebas dari patogen, (3) faktor-faktor yang mempengaruhi proses perbanyakan tanaman seperti zat-zat hara, zat pengatur tumbuh, cahaya dan temperatur dapat dengan mudah dikontrol, (4) memungkinkan untuk menghasilkan klon-klon dari tanaman yang pada dasarnya sangat sulit atau bahkan tidak memungkinkan untuk diperbanyak secara vegetatif makro, (5) proses produksi klon dapat berlangsung secara terus menerus sepanjang tahun tanpa tergantung pada musim (George & Sherrington, 1984).

Pembangunan plot konservasi eks-situ angšana

Upaya konservasi angšana sudah dilakukan di BBPPBPTH Yogyakarta sejak tahun 2015. Melalui kegiatan ini, materi genetik angšana telah berhasil dikoleksi dari lima pulau di Indonesia khususnya Indonesia Timur yaitu Pulau Flores, Nusa Tenggara Timur (NTT); Pulau Timor, Nusa Tenggara Timur (NTT); Pulau Seram, Maluku; Pulau Sumbawa, Nusa Tenggara Barat (NTB); dan Pulau Alor, Nusa Tenggara Timur (NTT) (Gambar 4) (Yuskianti *et al.*, 2015). Sebanyak ± 30 pohon induk berhasil dikoleksi dari kelima sebaran alami angšana tersebut. Jenis angšana yang berhasil dikoleksi juga ada dua jenis yaitu angšana yang mempunyai penampakan kulit buah yang tidak berduri (*P. indicus* forma *indicus*) dan berduri (forma *echinatus*) (Tabel 1).



Gambar 4. Koleksi materi genetik angšana (kayu merah) dari berbagai sebaran alami di Indonesia

Benih hasil koleksi dari lapangan kemudian digunakan untuk pembangunan plot konservasi eks situ angšana di dua lokasi di Indonesia. Kedua plot konservasi eks situ tersebut adalah:

Plot konservasi eks situ di Petak 95, Gunung Kidul, DI Yogyakarta

Plot ini bertujuan untuk uji keturunan dan menggunakan desain Rancangan Acak Kelompok dengan 5 blok sebagai ulangan dan 4 *tree plot*. Materi genetik yang ditanam berasal dari 3 populasi yaitu Pulau Timor (NTT), Pulau Flores (NTT) dan Pulau Seram (Maluku). Penanaman dilakukan menggunakan 67 famili (20 individual bibit dari setiap famili, kecuali pada famili 29), dengan jarak tanam 3 m x 3 m sehingga total luas areal plot adalah 1,2 hektar (Yuskianti *et al.*, 2016).



Plot konservasi eks situ di KHDTK Wonogiri

Plot konservasi eks situ angšana di KHDTK Wonogiri ditujukan untuk uji populasi dengan menggunakan desain *single tree plot*. Ada lima populasi yang ditanam di lokasi ini yaitu Pulau Flores (NTT), Pulau Timor (NTT), Pulau Alor (NTT), Pulau Sumbawa (Dompur) (NTB) dan Pulau Seram (Maluku). Jumlah tanaman untuk setiap plot menyesuaikan dengan ketersediaan bibit di persemaian. Total ada 2.170 bibit dari 5 populasi yang di tanam di KHDTK Wonogiri, Jawa Tengah (Yuskianti, Yelnitis, *et al.*, 2017).

Kegiatan pemeliharaan angšana di plot konservasi eks stu tersebut masih terus dilakukan hingga saat ini. Kegiatan tersebut berupa penyulaman, evaluasi pertumbuhan dan pemeliharaan rutin. Evaluasi pertumbuhan digunakan untuk mengetahui karakteristik pertumbuhan angšana di plot konservasi (famili dan populasi) dengan cara rutin melakukan pengukuran tinggi dan diameter tanaman. Sementara pemeliharaan berupa penyiangan, pemberian pupuk NPK dan penyemprotan hama penyakit juga rutin dilakukan untuk mendukung pertumbuhan angšana di plot konservasi. Keberadaan plot konservasi angšana ini diharapkan disamping dapat digunakan sebagai sumber koleksi materi genetik angšana juga dapat digunakan untuk mendukung pemuliaan dan pengembangan angšana selanjutnya di masa yang akan datang.

Konservasi angšana memerlukan kerjasama dari berbagai pihak. Sedikitnya yang mengetahui bahwa angšana mempunyai dua jenis yang dibedakan berdasarkan penampakan kulit buahnya (berduri dan tidak berduri) mengakibatkan tingginya tekanan terhadap angšana jenis tertentu (Yuskianti, Rochman, Lingga, & Daryono, 2019). Angšana jenis tidak berduri tampaknya telah banyak digunakan di Indonesia seperti untuk rehabilitasi lahan kritis di NTT (Hidayatullah, 2008), dan terutama banyak digunakan untuk taman kota/peneduh pinggir jalan (Inayah, 2010). Hal ini mengakibatkan adanya tekanan terhadap jenis angšana tertentu (tidak berduri) dibandingkan jenis yang berduri. Penelitian lanjutan tetap perlu dilanjutkan untuk mengetahui

seperti sebaran, budidaya dan manfaat dari kedua subspecies angšana.

Kesimpulan

Bioteknologi berperan besar dalam mendukung upaya konservasi angšana. Hasil penelitian keragaman genetik angšana secara molekuler menggunakan penanda RAPD menunjukkan tingkat keragaman genetik angšana yang rendah di sebaran alamnya. Hasil ini sejalan dengan penelitian lapangan yang menunjukkan adanya penebangan liar dan juga kurangnya regenerasi alami angšana serta sulitnya menemukan populasi angšana di beberapa wilayah di Indonesia seperti Pulau Flores, NTT. Adanya pembagian dua kelompok angšana secara genetik (dendogram dan PCoA) mengindikasikan adanya keterkaitan setiap kelompok dengan subspeciesnya. Hasil penelitian kultur jaringan angšana menunjukkan bahwa perlakuan kinetin memberikan rata-rata jumlah tunas paling banyak (kinetin 1.0 mg/l) sedangkan tunas tertinggi diperoleh pada perlakuan kinetin 3.0 mg/l. Hasil penelitian awal ini menunjukkan potensi pengembangan angšana secara kultur jaringan.

Ucapan terima kasih

Kegiatan penelitian konservasi angšana mendapatkan pendanaan melalui program RPPI Keanekaragaman Hayati Badan Litbang Inovasi, Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan (BLI KLHK) yang berjudul: Konservasi dan Bioteknologi Kayu Kuku, Kayu Merah/angšana dan Eboni pada DIPA Tahun Anggaran 2015-2019. Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu kegiatan konservasi angšana baik di lapangan, laboratorium, persemaian maupun plot konservasi eks-situ.

Kontribusi penulis

VY merencanakan rangkaian kegiatan penelitian, terlibat penelitian, dan berperan sebagai kontributor utama, sedangkan Y melakukan penelitian di laboratorium, kultur jaringan, dan



berperan sebagai kontributor anggota. Semua penulis telah membaca dan menyetujui isi makalah.

Daftar Pustaka

- Banerjee, P. (2013) Rapid in vitro propagation of *Acacia auriculiformis* on solid and liquid media : role of organic, additive, antioxidant and plant growth regulator. *Cibtech Journal of Bioprotocols* 2 (1) : 39 – 49
- Cha, H., Kim, W., Lee, M., Kim, S., Kim, S. H., Lee, K., ... Kim, T. (2016). Inhibitory effect of *Pterocarpus indicus* Willd water extract on IgE / Ag-induced mast cell and atopic dermatitis-like mouse models. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 8451, 1–9.
- Dharmawan, F. R. (2013). *Pengujian aktivitas hipoglikemik ekstrak air daun angkana Pterocarpus indicus Willd terhadap histopatologi sel hepar tikus diabetes aloksan*. Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.
- George, E. V., & Sherrington, P. . (1984). *Plant Propagation by Tissue Culture*. England: Eastern Press.
- Heyne, K. (1987). *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Jakarta: Yayasan Sarana Wana Wijaya.
- Hidayatullah, M. (2008). Rehabilitasi Lahan Dan Hutan Di Nusa Tenggara Timur. *Info Hutan*, V(1), 17–24.
- Inayah, S. N. (2010). *Studi kandungan Pb dan kadar debu pada daun angkana (Pterocarpus indicus) dan rumpun gajah mini (Axonopus sp) di pusat kota Tangerang*. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.
- IUCN. (2019). The IUCN Red List of Threatened Species Version 2019-2. <https://www.iucnredlist.org>, downloaded on 01 Oktober 2019.
- Jøker, D. (2000). *Pterocarpus indicus* Willd. In *Seed Leaflet Danida Forest Seed Centre No.37 September 2000*.
- Julianty, N. C., Nurzaman, M., & Mutaqin, A. Z. (2015). Hubungan karakteristik daun dengan akumulasi partikulat dan timbal (Pb) pada daun pohon *Pterocarpus indicus* Willd., *Swietenia macrophylla* King., dan *Filicium decipiens* (Wight & Arn)

- Thwaites di Kawasan Tamna Lansia kota Bandung. *Biotika (Jurnal Ilmiah Biologi)*, 13(2).
- Lestari, D. W., & Satria, Y. (2017). Pemanfaatan kulit kayu angkana (Pterocarpus indicus) sebagai sumber zat warna alam pada pewarnaan kain batik sutera. *Dinamika Kerajinan Dan Batik*, 34(1), 35–42.
- Nurtjahjansih, I.L.G., Sulistyawati, P., & Rimbawanto, A. (2016) Struktur genetik *Calliandra calothyrsus* di Indonesia menggunakan penanda Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD). *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 10 (1), 31-38.
- Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamburass, R., & Anthony, S. (2009). Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0.
- Putri, K. P., & Suita, E. (2005). Angkana (Pterocarpus indicus Willd). In *Atlas Benih Tanaman Hutan Indonesia, Jilid V (Edisi Khusus Andalan Jawa Barat)*, D. Rohadi, D.F. Djam'an, A. Aminah, dan R. Sitorus (Eds) (Vol. 4, pp. 7–9).
- Randriani, E., Tresniawati, C., & Syafaruddin. (2012) Pemanfaatan teknik Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) untuk pengelompokkan secara genetik plasma nutfah jambu mete (*Anacardium occidentale* L.). *Buletin RISTRI*, 3 (1), 1-6.
- Shiraishi, S., & Watanabe, A. (1995). Identification of chloroplast genome between Pinus densiflora Sieb et Zucc and P. thumbergii Parl based on the polymorphism in rbcL gene. *Journal of Japanese Forestry Society*, 77, 429–436.
- Shahinozzaman, M, M. Abdul, K. Azad & MN. Amin. (2012) In vitro clonal propagation of a fast growing legume tree *Acacia mangium* Willd. employing cotyledonary node explants. *Notulae Scientia Biologicae* 4 (2) : 79 – 85.
- Sulistyawati, P., & Widayatmoko, A. (2017). Keragaman genetik populasi kayu Merah (*Pterocarpus indicus* Willd) menggunakan penanda Random Amplified Polymorphism DNA. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 11(1), 67–76.
- Thorpe, T. A., & Patel, K. R. (1984). *Clonal Propagation : Adventitious Bud. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol 1*. Massachusetts, USA: Academic Press. Inc.



- Yuskianti, V., Ismail, B., & Pamungkas, T. (2017). Sebaran alami kayu merah (*Pterocarpus indicus* Willd.) di Pulau Flores Nusa Tenggara Timur. In A. Septiasari, A. Astuti, I. N. Berlian, K. Kharismamurti, N. C. Merdekawati, & Y. R. Alkarim (Eds.), *Prosiding Seminar Nasional Biodiversitas Vol. 6 No. 3* (pp. 124–128). Solo: Kelompok Studi Biodiversitas Program Studi Biologi FMIPA UNS.
- Yuskianti, V., Ismail, B., & Yuliah. (2017). Eksplorasi Materi Genetik Kayu Merah (*Pterocarpus indicus* Willd.) di Pulau Sumbawa, Nusa Tenggara Barat. *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi Dan Saintek "Isu-Isu Strategis Sains, Lingkungan Dan Inovasi Pembelajarannya,"* 258–265.
- Yuskianti, V., Rochman, A. P. S., Lingga, N. O., & Daryono, B. S. (2019). Karakter morfologi dan pertumbuhan subspecies kayu merah (*Pterocarpus indicus* Willd) asal Pulau Seram, Maluku dan Pulau Flores, NTT di persemaian. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 13(1), 1–7.
- Yuskianti, V., Widyatmoko, Y., Yelnitis, Charomaini, M., Ismail, B., Pamungkas, T., Triyanta. (2015). *Konservasi dan bioteknologi untuk jenis kayu kuku, kayu merah dan eboni*. Yogyakarta.
- Yuskianti, V., Yelnitis, Charomaini, M., Ismail, B., Pamungkas, T., Prastyono, Hartono. (2016). *Konservasi untuk Jenis Kayu Kuku, Kayu Merah dan Eboni*. Yogyakarta.
- Yuskianti, V., Yelnitis, Ismail, B., Pamungkas, T., Yuliah, Putri, A. I., Hartono, R. (2017). *Konservasi untuk Jenis Kayu Kuku, Kayu Merah, dan Eboni*. Yogyakarta.

In-Silico Study of Cucurbitacin as An Alternative Compound for Anticancer

Wiko Arif Wibowo¹, Muhammad Zulfikar², Slamet Widiyanto², Budi Setiadi Daryono¹

¹Genetics and Breeding Laboratory, Faculty of Biology,
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

²Animals Physiology Laboratory, Faculty of Biology,
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Abstract. One of the common symptoms of cancer is the cell's growth abnormally. Currently, cancer treatment was conducted by chemotherapy. Doxorubicin was commonly used for chemotherapy through the TOP2A inhibition pathway. However, long-term use of doxorubicin is thought to have a negative impact in the form of cardiotoxicity and multidrug resistance. Cucurbitacin compounds are natural ingredients that are generally produced by the Cucurbitaceae family plant. There are various types of cucurbitacin compounds which are generally believed to have anti-cancer activity. This study aimed to explore the potential for anti-cancer in various types of cucurbitacin compounds using in silico approach. DNA topoisomerase 2- α protein (TOP2A) was obtained from Protein Database (PDB) while a model of the compounds doxorubicin and cucurbitacin A, B, C, D, E, F, and collected from the chemical molecule database (PubChem). Molecular docking analysis was carried out using PyRx, while the analysis of DNA topoisomerase 2- α interaction with each ligand was analyzed by PyMol. The results showed that, in general, the whole cucurbitacin compound tested had potential as an anti-cancer compound, with the highest bond energy value of -8.7 Kcal/mol in cucurbitacin E. Those value was higher than the control which was only -8.2 Kcal/mol.

Keywords: *Doxorubicin; TOP2A; Cucurbitacin; Anti-cancer; Molecular docking*

Introduction

Cucurbitacin is a natural compound of the tetracyclic triterpenoids group with extensive bioactive abilities and is found commonly in the Cucurbitaceae plant group (Hussain *et al.*, 2019)



(Kaushik *et al.*, 2015). Cucurbitacin compounds are characterized by the basic framework of the compound in the form of 19- (10 \rightarrow 9 β) - abeo-10 α - lanost - 5-ene ring skeleton (Dinan *et al.*, 2001). Cucurbitacin is different compared to other tetracyclic triterpenoid compounds because it is highly unsaturated and contains keto-, hydroxyl, and acetoxy groups (Jorn *et al.*, 2006). Cucurbitacin compounds are divided into various types which are coded with the letters A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, O, P, Q, R and S which are distinguished from the presence of various functional groups in rings A and C, diversity inside chains, and stereochemical considerations. Some preliminary tests have proven that the cucurbitacin compound has bioactive ability in several cancer cases, including pancreatic cancer (Iwanski *et al.*, 2010), breast cancer (Duangmano *et al.*, 2010) (Wakimoto *et al.*, 2008) (Promkan *et al.*, 2013), and tumor angiogenesis (Dong *et al.*, 2010).

At present, cancer treatments generally use doxorubicin as an agent in chemotherapy. Doxorubicin is a type of Anthracycline drug that has been used in many cancer treatments, including breast, lung, gastric, ovarian, thyroid, non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphoma, multiple myeloma, sarcoma, and pediatric cancers (Arcamone *et al.*, 1969; Cortes -Funes *et al.*, 2007; Weiss 1992). However, the use of doxorubicin in high doses and prolonged periods are believed to have a negative impact, namely cardiotoxicity and multidrug resistance (Singal *et al.*, 2001; Schaltner *et al.*, 2006; Popov 2005). There are two mechanisms of the doxorubicin pathway in cells, namely intercalation into DNA by interfering with the mechanism of DNA repair by topoisomerase-II and damaging DNA, protein, and the whole-cell as free radical agents (Thorn *et al.*, 2011). DNA repair is closely related to the activity of topoisomerase-II, which is influenced by several types of genes, namely TOP2A, MLH1, MSH2, TP53, and ERCC2 (Tewey *et al.*, 1984). Among these genes, the evidence for TOP2A gene involvement is indisputable (Oakman *et al.*, 2009). So the purpose of this research is to see the binding ability of various types of Cucurbitacin compounds in specific target proteins (TOP2A)

which incidentally as one of the proteins directly involved in the doxorubicin pathway in substituting the role of these compounds in cells.

Materials and methods

Ligand preparation

The ligand compound used was Doxorubicin as a control and 7 bioactive compounds Cucurbitacin selected based on screening results from Lipinski's rule of five (RO5), including Cucurbitacin A (CuA), Cucurbitacin B (CuB), Cucurbitacin C (CuC), Cucurbitacin D (CuD), Cucurbitacin E (CuE), Cucurbitacin F (CuF), and Cucurbitacin I (CuI). Cucurbitacin compounds from the screening results were collected from the PubChem database (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) to obtain samples with a structured data format (.sdf) format. Then the sample is minimized, and the sample format is converted into a data bank protein (.pdb) using Open Babel in PyRx 0.8 software.

Target protein preparation

TOP2A protein samples were collected from Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/structure/5GWK>) to obtain protein samples with protein data bank format (.pdb) [ID: 5GWK]. Furthermore, sterilization was carried out on protein samples using EduPyMol v1.7.4.5 software. Sterilization is done by removing water molecules and ligands from the protein structure of the sample.

Molecular docking

Molecular docking was carried out using the AutoDock Vina program in PyRx 0.8 software between TOP2A protein and ligands consisting of 7 types of Cucurbitacin and Doxorubicin compounds as controls. The grid sizes used are Center (Å) X: 19.3076 Y: -32.908 Z: -48.0381 and Dimensions (Å) X: 87.6337 Y: 92.6871 Z: 106.5757. Each docking molecule is stored in a protein data bank (.pdb) format.

Visualization and analysis of chemical bond interaction

The docking results are visualized using EduPyMol v1.7.4.5 software. Ligand position and interaction values were obtained for further analysis using the PoseView webserver on Proteins Plus (<https://proteins.plus/>).

Results

Target protein structure

TOP2A protein (ID: 5GWK) has two leading chains, namely, chain A and B, with a sequence length of 806 (Figure 1a) (Wang *et al.*, 2017). In the TOP2A protein structure, there are two small molecules, EVP and MG. EVP is etoposide, a podofilox derivative semisynthetic compound, which plays a role in antitumor activity (Figures 1b and 1c). Etoposide works by forming complexes with topoisomerase II and DNA so that it induces damage to the double helix structure of DNA and prevents repair by binding to topoisomerase II (Knox *et al.*, 2011).

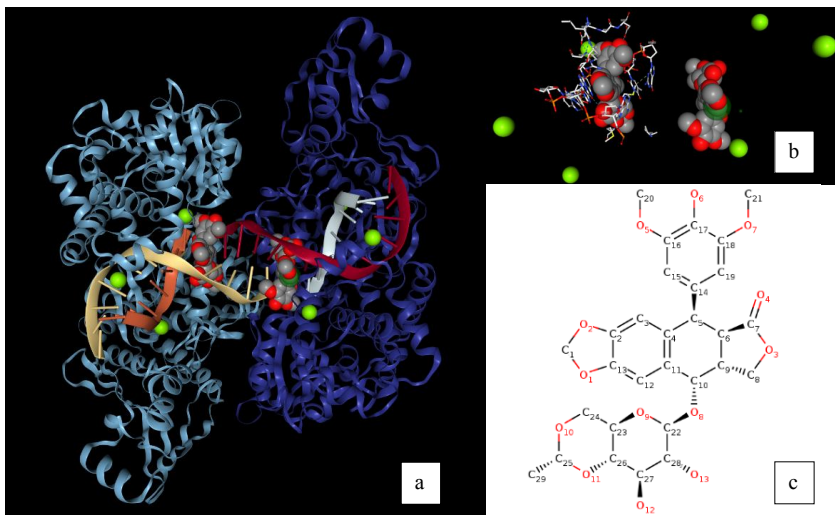


Figure 1. Structure of TOP2A protein with small molecules D and F (a); Ligand view [EVP] 102: F (b); and EVP, etoposide $C_{29}H_{32}O_{13}$ (c)

The structure of the TOP2A protein allows Doxorubicin to have a pathway in metabolic drugs to influence the activity of the TOP2A protein during cell division. Chain A and B were used in this *in silico* study but eliminated the structure of small molecules so as not to affect the ligand bonds and interactions that would form in the molecular docking process.

Affinity binding value

Molecular docking results are presented in Table 1. which represents the binding energy between the ligand and protein. The lower the bonding energy formed, the higher the ability of the ligand to form protein-ligand complex compounds.

Table 1. The value of binding affinity between ligands and proteins

No	Ligand	Binding Affinity (Kcal/mol)	RMSD lower bound	RMSD upper bound
1	Doxorubicin	-8,2	20.091	25.326
2	CuA	-8,1	38.585	41.985
3	CuB	-8,0	36.897	40.768
4	CuC	-7,4	13.145	19.337
5	CuD	-7,9	35.685	39.031
6	CuE	-8.7	4.136	8.431
7	CuF	-8.4	19.408	23.806
8	CuI	-8.2	19.316	23.264

The results obtained indicate the Doxorubicin binding affinity value of -8.2 Kcal/mol, the value is lower or equal to the binding affinity value of the compounds Cucurbitacin E (CuE), Cucurbitacin F (CuF), and Cucurbitacin I (CuI) respectively -8.7; -8.4; and -8.2 Kcal/mol.

Visualization of ligand position

Ligands have specific structures that can bind to specific parts of a protein. The docking process using a grid that accommodates the entire surface of the protein will produce a binding site that

can form on each protein surface. Visualization of the position of ligand binding sites on proteins is presented in Figure 2.

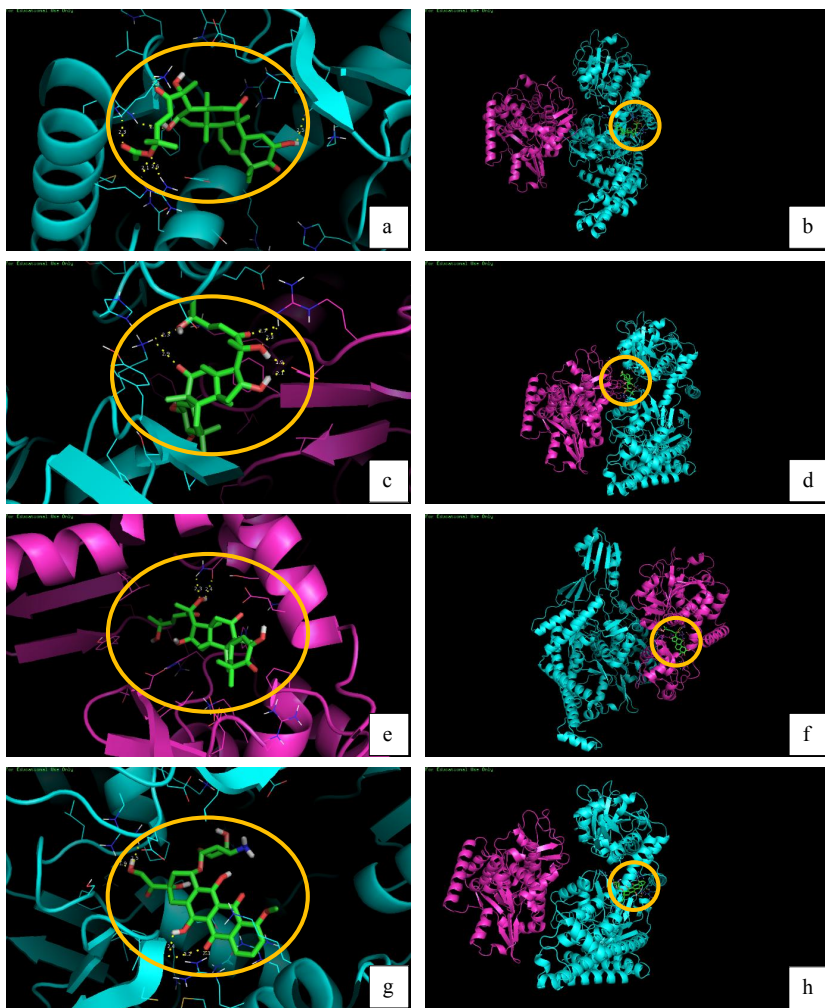


Figure 2. Visualization of the binding site position of each ligand on TOP2A protein, Cucurbitacin E (a-b); Cucurbitacin F (c-d); Cucurbitacin I (e-f); and Doxorubicin (g-h)

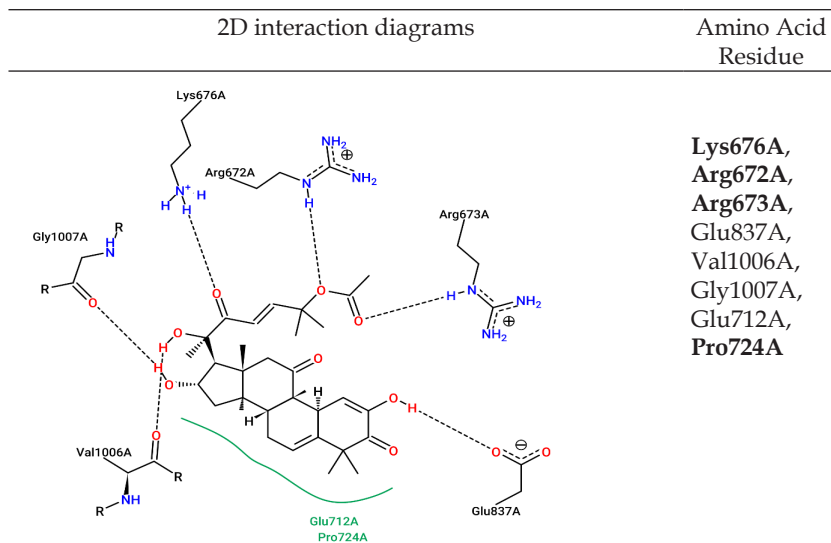
The position of the Doxorubicin ligand is in chain A of TOP2A (Figure 2g-h). A similar binding site position is occupied by the Cucurbitacin E ligand in chain A (Figure 2a-b). While Cucurbitacin I ligands have binding sites in chain B (Figure 2e-f) and Cucurbitacin F ligands interact with chain A and chain B (Figure 2c-d).

Interaction of ligands and protein

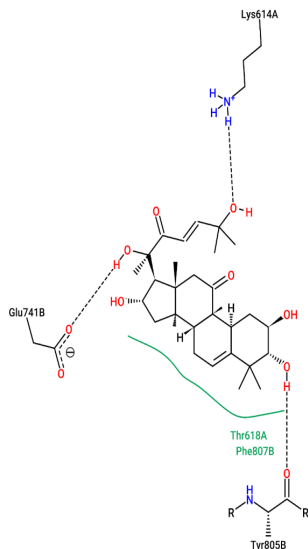
Further analysis of the position of the ligand at the protein binding site was carried out to see the interaction of the ligand and protein. Analysis of the interaction of ligands and proteins can be hydrogen bonds, hydrophobic bonds, and amino acid residues. This analysis can see the amino acids making up proteins that directly interact with the ligand. Interactions of ligands and proteins based on amino acids making up proteins are presented in Table 2.



Table 2. Interactions of ligands and proteins

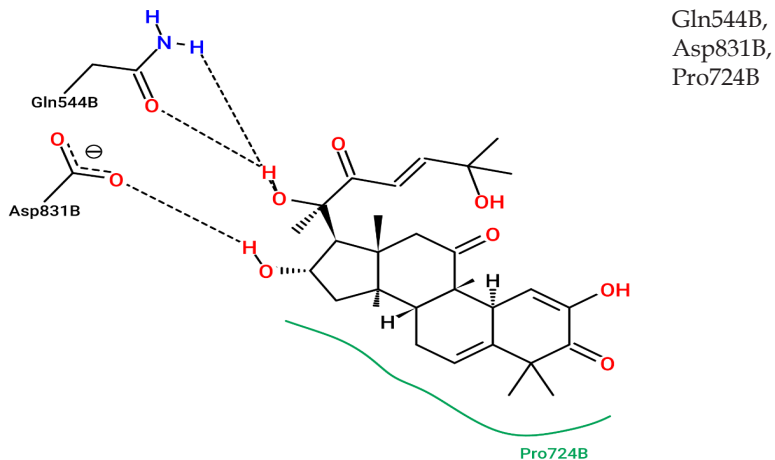


Cucurbitacin E

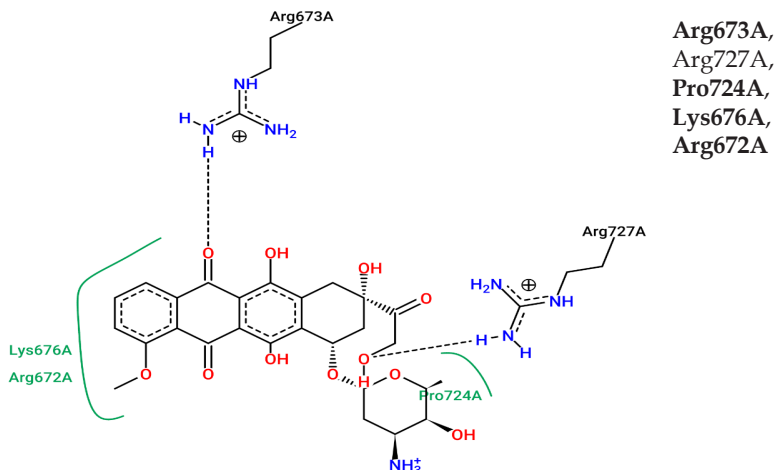


Lys614A,
Tyr805B,
Thr618A,
Phe807B,
Glu741B

Cucurbitacin F



Cucurbitacin I



Doxorubicin

Based on the position of the ligand (Figure 2), Cucurbitacin E has a similar position to Doxorubicin (control), and this is proven through the analysis of interactions presented in Table



2. The Doxorubicin binding site in the TOP2A protein A chain is almost entirely the binding site of Cucurbitacin E except for Arg727A (Table 2). Meanwhile, for Arg673A, Pro724A, Lys676A, and Arg672A at the Doxorubicin binding site are also part of the Cucurbitacin E binding site. From the results of Table 2, it shows that Cucurbitacin E has more interactions than Doxorubicin in the presence of hydrogen bonds, hydrophobic bonds, and residual sites. A total of 8 amino acids. The least interactions were found in Cucurbitacin I ligands with three amino acid residues, while in Cucurbitacin F, the formed interactions were found in chain A and chain B of the TOP2A protein.

Discussion

TOP2A protein is a protein that is directly affected in one of the Doxorubicin pathways in damaging a cell. The binding position of Doxorubicin in the TOP2A protein is in the EVP ligand in the D and F chains as small molecules of TOP2A ID 5GWK (Wang *et al.*, 2017). In the process of protein sterilization, this part is removed to make the TOP2A protein-free be able to bind to potential ligands.

Natural compounds used as ligands in the docking process are various types of Cucurbitacin compounds that have been screened using Lipinski's Rule of Five (RO5). There are seven types of Cucurbitacin compounds, namely Cucurbitacin A, B, C, D, E, F, and I and Doxorubicin as a control. The lowest binding affinity values interpret low bond energy so that it has a ligand-binding probability at the site active protein (Kharisma *et al.*, 2018). Lower affinity binding values of Doxorubicin were obtained from the Cucurbitacin E, F, and I compounds, respectively. The low binding energy of the three types of Cucurbitacin compounds indicates the potential to replace Doxorubicin in the same metabolic pathway for the TOP2A protein target.

Based on the chemical bond interactions that occur supporting Cucurbitacin E which has the lowest binding affinity value, where the Cucurbitacin E binding site is in chain A, the same binding position found in Doxorubicin. Besides that, the coverage area of

the Cucurbitacin E binding is broader and covers the Doxorubicin area, including the interaction of hydrogen bonds, hydrophobic bonds, and amino acid residues from binding. Doxorubicin interacts with five amino acids, 4 of which were also found to interact with Cucurbitacin E, namely Arg673, Pro724A, Lys676A, and Arg672A. In addition to these amino acids, Cucurbitacin E also interacts with Glu837A, Val1006A, Gly1007A, Glu712A (Table 2). Interaction capabilities that cover a wider binding region are likely to bind better to the target protein (Shahinozzaman *et al.*, 2019). This confirms the ability of Cucurbitacin E as a potential bioactive compound used in the treatment of cancer, supported by the nature of Cucurbitacin, which is very unsaturated so that it does not cause free radical reactions in the body that can have a negative impact.

Conclusions

Cucurbitacin compounds can bind to the TOP2A protein. Cucurbitacin E, F, and I each have lower binding affinity values than controls. Cucurbitacin E has a binding site similar to Doxorubicin and has the potential for further specific research to see the Cucurbitacin E pathway in damaging cancer cells in vitro and in vivo.

Acknowledgments

This research was supported by the Ministry of Technology Research and Higher Education of the Republic of Indonesia through PMDSU Grants through contract number 2936 / UN1. DITLIT / DIT-LIT / LT / 2019.

Authors' contributions

WAW wrote and did molecular docking, MZ and SW analyzed the results of docking on TOP2A protein and the Doxorubicin pathway in cells, BSD wrote and analyzed the results as a whole.



References

- Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, *et al.*, 1969. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin: a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng.* 11:1101–1110.
- Cortes-Funes H, Coronado C. 2007. Role of anthracyclines in the era of targeted therapy. *Cardiovasc Toxicol.* 7:56–60.
- Dinan L, Harmatha J, Lafont R. 2001. Chromatographic procedure for the isolation of plant steroids. *J Chromatogr A.* 935:105–23.
- Dong Y, Lu B, Zhang X, Zhang J, Lai L, Li D, Wu Y, Song Y, Luo J, Pang X, *et al.*, 2010. Cucurbitacin E, a tetracyclic triterpenes compound from Chinese medicine, inhibits tumor angiogenesis through VEGFR2-mediated Jak2 – STAT3 signaling pathway. *Carcinogenesis.* 31(12):2097–2104.
- Duangmano S, Dakeng S, Jiratchariyakul W, Suksamrarn A. 2010. Antiproliferative Effects of Cucurbitacin B in Breast Cancer Cells : Down-Regulation of the c-Myc / hTERT / Telomerase Pathway and Obstruction of the Cell Cycle. :5323–5338.
- Hussain H, Green IR, Saleem M, Khattak KF, Irshad M, Ali M. 2019. Cucurbitacins as Anticancer Agents: A Patent Review. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 14(2):133–143.
- Iwanski GB, Lee DH, En-gal S, Doan NB, Castor B, Vogt M, Toh M, Bokemeyer C, Said JW, Thoennissen NH, *et al.*, 2010. Cucurbitacin B, a novel in vivo potentiator of gemcitabine with low toxicity in the treatment of Abbreviations : *Br J Pharmacol.* 160:998–1007.
- Jorn G, Inge S, Hans CA. 2006. Cucurbitacins in plant food. *TemaNord.* 556.
- Kaushik U, Aeri V, Mir SR. 2015. Cucurbitacins – An insight into medicinal leads from nature. *Pharmacogn Rev.* 9(17):12–18.
- Kharisma VD, Syafrudin S, Septiadi L. 2018. Prediction of Novel Bioactive Compound from *Zingiber officinale* as Non-Nucleoside Reverse. 1(2):49–55.
- Knox C, Law V, Jewison T, Liu P, Ly S, Frolkis A, Pon A, Banco K, Mak C, Neveu V, *et al.*, 2011. DrugBank 3.0: A comprehensive

- resource for “Omics” research on drugs. *Nucleic Acids Res.* 39(SUPPL. 1).
- Oakman C, Moretti E, Galardi F, Santarpia L, Di Leo A. 2009. The role of topoisomerase II α and HER-2 in predicting sensitivity to anthracyclines in breast cancer patients. *Cancer Treat Rev.* 35(8):662–667.
- Promkan M, Dakeng S, Chakrabarty S, Bogler O, Patmasiriwat P. 2013. The Effectiveness of Cucurbitacin B in BRCA1 Defective Breast Cancer Cells. 8(2).
- Shahinozzaman M, Ishii T, Ahmed S, Halim MA, Tawata S. 2019 Sep 5. A computational approach to explore and identify potential herbal inhibitors for the p21-activated kinase 1 (PAK1). *J Biomol Struct Dyn.*:1–13.
- Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BD, Liu LF. 1984. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science* (80-). 226(4673):466–468.
- Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, Altman RB. 2011. Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics.* 21(7):440–446.
- Wakimoto N, Yin D, Kelly JO, Haritunians T, Karlan B, Said J, Xing H, Koeffler HP. 2008. Cucurbitacin B has a potent antiproliferative effect on breast cancer cells in vitro and in vivo. 99(9):1793–1797.
- Wang Y-R, Chen S-F, Wu C-C, Liao Y-W, Lin T-S, Liu K-T, Chen Y-S, Li T-K, Chien T-C, Chan N-L. 2017. Producing irreversible topoisomerase II-mediated DNA breaks by site-specific Pt(II)-methionine coordination chemistry. *Nucleic Acids Res.* 45(18):10861–10871.
- Weiss RB. 1992. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin Oncol.* 19:670–686.
- Zheng CH, Fu HW, Pei YH. 2006. A new Cucurbitacin from *Bolbostemma paniculatum* Franguent. *J Asian Nat Prod Res.* 9:187–90.



ISBN 978-623-91470-1-3



9 786239 147013